



REC'D 06 JAN 1997  
WIPO PCT  
PCT/FR96/01937  
11 DEC 1996

09/077606

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

PRIORITY DOCUMENT

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef de Division

Yves CAMPENON

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
25 bis rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cedex 08  
Telephone : 01 53 04 53 04  
Telecopie : 01 42 93 59 30



# REQUETE

EN DÉLIVRANCE D'UN  
TITRE DE PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE \*

DATE DE REMISE DES PIÈCES  
**05 DEC 1995**

N° DE REGISTREMENT NATIONAL  
**95 14336 -**

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT  
**75**

a ☒ BREVET D'INVENTION  
b ☐ CERTIFICAT D'UTILITÉ  
c ☐ DEMANDE DIVISIONNAIRE  
d ☐ TRANSFORMATION D'UNE  
DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

Pour a et d, précisez Nature, N° et date de la  
demande initiale

DATE DE DÉPÔT

**05 DEC 1995**

4 NUMÉRO DU POUVOIR PERMANENT

## 2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

LE DEMANDEUR REQUIERT  
L'ÉTABLISSEMENT DIFFÉRE  
DU RAPPORT DE RECHERCHE

OUI

☒ NON

SI L'OPTION CHOISIE EST NON ET  
SI LE DEMANDEUR EST UNE  
PERSONNE PHYSIQUE, IL  
REQUIERT LE PAIEMENT  
ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE  
DE RAPPORT DE RECHERCHE

OUI

☒ NON

NATURE

NUMÉRO

DATE DE LA DEMANDE INITIALE

## 3 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À CUI TOUTE LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet ARMENGAUD AÎNÉ

3, Avenue Bugeaud

75116 PARIS

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT

**58447**

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT

## 7 TITRE DE L'INVENTION

"Composés possédant des propriétés lectiniques, et leurs applications  
biologiques".

## 8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

ASSOCIATION POUR LE DÉVELOPPEMENT DE LA BIOTHERAPIE  
EXPERIMENTALE ET APPLIQUÉE.  
(A.D.B.E.A.)

## 9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

Hôpital Saint Vincent de Paul  
74-82, Avenue Denfert Rochereau  
75674 PARIS CEDEX 14

PAYS

FRANCE

## 10 NATIONALITÉ(S)

Française

☒

DE DÉPÔT

REDEVANCES VERSÉES

☒

DE RAPPORT DE RECHERCHE

☐

DE REVENDICATION DE PRIORITÉ

☐

DE REVENDICATION (à partir de la 11e)

## 11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE  
INVENTEUR

OUI

Si la réponse est non voir notice explicative

☒ NON

## 12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE  
PHYSIQUE NON IMPOSABLE, IL  
REQUIERT QU'IL A REQUIS LA RÉDUCTION  
DES REDEVANCES

OUI

☒ NON

## 13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE  
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE  
DEMANDE ANTÉRIEURE

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

## 14

DIVISIONS

ANTÉRIEURES À LA  
PRÉSENTE DEMANDE

N°

N°

N°

N°

15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
NOM ET QUALITÉ DU SIGNATAIRE - N° D'INSCRIPTION

Mandataire: Chantal PEAUCELLE

N° 921189

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

Division Administrative des Brevets

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° d'enregistrement national

9514336

**Titre de l'invention :** "Composés possédant des propriétés lectiniques, et leurs applications biologiques "

**Le (s) soussigné (s)** Madame PEAUCELLE Chantal

**désigne (nt) en tant qu'inventeur (s)** (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- 1) Jiang PAN HONG - Institut National des Vaccins et Sérums  
100024 SAN JIAN FANG (CHAO YANG DISTRICT)  
PEKIN, CHINE
- 2) KABA Aboubacar  
8 Grande Allée des Hauts Bâtons  
93160 NOISY LE GRAND
- 3) CHANY-FOURNIER Françoise - 34 rue du Docteur Blanche - 75781 PARIS CEDEX 16
- 4) CERUTTI Italina - 47 rue Georges Clémenceau  
94210 LA VARENNE SAINT HILAIRE
- 5) CHANY Charles - 34 rue du Docteur Blanche - 75781 PARIS CEDEX 16

**NOTA :** A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Le 5 Décembre 1995

N°92-1189



# DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDI- CATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
68 et 72			X	20.05.96	
20, 22				96	

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

Composés possédant des propriétés lectiniques,  
et leurs applications biologiques.

5 L'invention concerne des composés possédant des  
propriétés lectiniques, et leurs applications  
biologiques.

Elle vise plus particulièrement des protéines  
ou des polypeptides du type des sarcolectines.

10 On sait que ce terme a été utilisé pour  
désigner les lectines identifiées dans les sarcomes  
ostéogéniques humains ou ceux induits chez le hamster  
(après inoculation du virus du sarcome de Moloney), où  
elles sont présentes selon des teneurs élevées. Mais les  
sarcolectines se trouvent également dans une grande  
15 variété de tissus normaux ou tumoraux chez les Vertébrés  
(primates, rongeurs, gallinacés).

Elles peuvent aussi être détectées à la surface  
des cellules normales ou transformées d'origine humaine  
ou animale.

20 Des préparations purifiées de sarcolectines ont  
déjà été décrites et leurs propriétés rapportées.

Les propriétés physico-chimiques les plus  
régulièrement caractérisées sont :

25 - la sensibilité aux protéases (trypsine,  
Pronase<sup>R</sup>), mais aussi la résistance aux traitements  
ménagés, dans certaines conditions, à la pepsine ;

- la résistance à des variations thermiques (-20°C à + 100°C) ;

- la résistance aux variations de pH (2 à 8) ;

5 - la résistance aux détergents tels que SDS et dithiothréitol ;

- la migration en gel SDS-PAGE de la protéine dans la région des PM de 65-55 kD.

10 Leurs propriétés biologiques sont de trois ordres (voir les références (1) à (8) données en fin de description, avec les autres références citées ci-après, dans le document "Références bibliographiques") :

15 - agglutination des cellules normales ou transformées (activité au niveau de la membrane cellulaire). La cyto-agglutination peut être inhibée grâce à l'affinité des sarcolectines pour des sucres simples.

20 - stimulation de la croissance des lymphocytes humains T et B, des cellules lymphoïdes Daudi, et des cellules adhérentes au substrat, telles que des cellules murines L929, des fibroblastes de rat transformés (Fr3T3) et des fibroblastes humains (FS4). Ainsi, les sarcolectines se comportent comme des promoteurs de la croissance cellulaire, de spécificité non déterminée ;

25 - diminution ou abolition de l'état antiviral pré-établi par l'interféron (IFN) et restauration dans la cellule de la sensibilité initiale au virus. Après établissement de la résistance antivirale, les SCL

inhibent la poursuite de la synthèse des protéines interféron-dépendantes, par exemple la protéine kinase et la 2-5A synthétase. La restauration de l'état initial est fonction des doses de SCL et peut être plus ou moins  
5 complète. Lorsque la cellule est restaurée, il est possible soit de stimuler la croissance par les SCL ou par d'autres facteurs de croissance, soit au contraire de retraiter les cellules par l'IFN pour développer à nouveau la résistance antivirale.

10 L'invention repose sur l'obtention de préparations de SCL hautement purifiées qui ont permis d'élaborer des stratégies conduisant à l'isolement de clones d'ADNc codant pour une protéine de 55 kD dont l'étude a révélé des propriétés biologiques inattendues.

15 L'invention a donc pour but de fournir divers produits se rattachant à la SCL de 55 kD, à savoir notamment, protéines, polypeptides ou leurs fragments, séquences d'ADN codant pour ces protéines ou ces polypeptides, ou leurs fragments, ou au contraire  
20 inhibant leur expression, et anticorps dirigés contre ces protéines, polypeptides, ou leurs fragments.

Le terme sarcolectine ou SCL, tel qu'utilisé dans la suite de la description, désignera indifféremment les protéines, polypeptides et fragments de ces composés,  
25 ou encore leurs dérivés, dès lors qu'ils possèdent des propriétés lectiniques comme défini selon l'invention.

Elle vise également des procédés d'obtention de ces différents produits.

Selon un autre aspect, l'invention vise en  
30 outre les applications biologiques de ces produits.



Les séquences de nucléotides selon l'invention sont des séquences isolées de leur environnement naturel et sont caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie de la séquence SEQ ID N° 1, un ou plusieurs  
5 nucléotides étant le cas échéant modifiés, étant entendu que ces séquences sont capables de coder pour des sarcolectines, c'est-à-dire des protéines, des polypeptides, ou des fragments de ces composés, ou encore des dérivés, possédant des propriétés lectiniques.

10 La séquence SEQ ID N° 1 est donnée en fin de description, avec les autres séquences mentionnées ci-après, dans le document appelé "Liste des séquences".

Par propriétés lectiniques, on entend la capacité des SCL à agglutiner des cellules normales ou  
15 transformées, leur effet stimulant sur la croissance cellulaire et leur effet inhibiteur de l'effet anti-viral induit par l'interféron, dans les conditions décrites dans (8).

De telles séquences, mises en oeuvre selon les  
20 techniques classiques de l'ADN recombinant sont capables de coder pour des protéines ou des polypeptides, ou encore leurs fragments, présentant une activité lectinique, comprenant au moins un enchaînement d'acides aminés tel qu'indiqué sur SEQ ID N° 1, dans lequel un ou  
25 plusieurs acides aminés sont, le cas échéant, modifiés.

Ces séquences sont encore caractérisées en ce qu'elles sont capables de s'hybrider avec au moins un fragment de SEQ ID N° 1 portant au moins une partie de l'information génétique pour une sarcolectine. Cette

hybridation peut être réalisée dans des conditions stringentes, mais également dans des conditions relaxes telles que décrites dans (10).

5 L'invention vise en particulier la séquence de nucléotides correspondant au cadre ouvert de lecture allant de la position 62 à la position 1469 dans SEQ ID N° 1.

10 Dans cette séquence, les domaines des extrémités 5' et/ou extrémités 3' sont spécialement préférés, étant donné qu'ils renferment l'information génétique pour les fragments possédant lesdites propriétés lectiniques.

15 A cet égard, la séquence d'environ 405 pb allant de la position 62 à 467 dans SEQ ID N° 1, telle que représentée sur SEQ ID N° 2, est tout particulièrement préférée.

Ces domaines 5' et 3' sont caractérisés en ce qu'ils renferment une forte proportion d'acides aminés phosphorylables, comme les sérine, thréonine et tyrosine.

20 Les différentes séquences mentionnées dans ce qui précède peuvent être des séquences génomiques ou de type génomique, certains enchaînements de nucléotides pouvant être séparés par des introns qui seront excisés pour conduire à l'expression des SCL matures.

25 Les séquences d'ARNm correspondantes, ou encore les séquences anti-sens correspondant aux séquences définies ci-dessus, ainsi que les séquences complémentaires de ces différentes séquences, entrent également dans le champ de l'invention.

Ces différentes séquences de nucléotides sont encore caractérisées en ce qu'elles sont dépourvues d'ADN de mammifères, d'agents infectieux, de prions et d'autres matériaux des produits naturels.

5 Comme indiqué ci-dessus, les séquences dérivées de SEQ ID N° 1 sont également visées par l'invention.

Ces séquences dérivées sont obtenues par modification, substitution, altération, mutation ou délétion génétique et/ou chimique d'un ou plusieurs  
10 nucléotides de SEQ ID N° 1 ou d'un fragment de SEQ ID N° 1, étant entendu qu'elles possèdent une information génétique pour coder pour une SCL conservant au moins en partie l'activité lectinique présentée par le polypeptide codé par SEQ ID N° 1, cette activité étant le cas échéant  
15 augmentée.

Ces modifications permettent, si on le souhaite, d'adapter les séquences définies ci-dessus à l'expression dans un type de vecteur ou d'hôte, ou encore de faciliter la pénétration cellulaire du polypeptide  
20 codé ou d'augmenter son activité.

L'invention vise également les vecteurs d'expression contenant au moins l'une des séquences de nucléotides définies ci-dessus, soumises au contrôle d'un promoteur approprié. Elle vise en particulier les  
25 vecteurs comprenant tout ou partie de SEQ ID N° 1 ou de SEQ ID N° 2, ou leurs séquences anti-sens.

Les cellules hôtes transfectées par ces vecteurs, qui comprennent les protéines recombinantes exprimées font également partie de l'invention.

Les cellules utilisées pour les transfections sont, de manière classique, des cellules eucaryotes ou procaryotes ou encore des cellules végétales.

5 L'invention vise également, en tant que produits chimiques nouveaux, des SCL présentant des propriétés lectiniques telles que définies ci-dessus.

10 L'invention vise ainsi des protéines ou des polypeptides, ou encore leurs fragments, ou leurs dérivés, caractérisés en ce qu'ils possèdent une activité lectinique et comprennent au moins une partie d'un enchaînement d'acides aminés dans la séquence codée par l'une des séquences de nucléotides définies ci-dessus, un ou plusieurs acides aminés étant le cas échéant modifiés, dès lors que cette modification n'altère pas les  
15 propriétés lectiniques des protéines, des polypeptides, ou de leurs fragments, ou de leurs dérivés.

L'invention vise notamment les SCL présentant un enchaînement d'acides aminés dans SEQ ID N° 3 ou dans SEQ ID N° 4.

20 La SCL correspondant au cadre ouvert de lecture dans la séquence SEQ ID N° 1 comprend 469 acides aminés et possède un poids moléculaire évalué à 55 kD.

25 Les séquences des régions 5' et/ou 3' de SEQ ID N° 3, en particulier celles de la région 5' correspondant à SEQ ID N° 4, sont essentiellement responsables de la fonction lectinique des SCL définies ci-dessus.

30 Les SCL de l'invention sont encore caractérisées en ce qu'elles sont telles qu'obtenues par expression, dans une cellule hôte appropriée, selon les techniques de l'ADN recombinant, d'un vecteur

d'expression contenant une séquence d'ADN telle que définie plus haut, récupération de la SCL exprimée et purification.

5 D'autres SCL de l'invention sont des fragments ou des dérivés obtenus par modification des séquences SEQ ID N° 3 ou SEQ ID N° 4, dès lors qu'elles conservent au moins en partie les propriétés lectiniques définies ci-dessus.

10 Comme indiqué en rapport avec les séquences de nucléotides, on entend par modification, toute mutation, délétion, substitution et/ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, obtenue directement au niveau de l'enchaînement d'acides aminés, ou indirectement en modifiant la séquence de nucléotides codante.

15 D'autres SCL encore sont telles qu'obtenues par purification à partir d'extraits tissulaires.

L'invention vise en particulier les SCL purifiées telles qu'obtenues à partir d'extraits tissulaires, en opérant comme suit :

20 - traitement de l'extrait tissulaire contenant des lectines par de la pepsine de manière ménagée ou à pH acide, dans des conditions permettant d'éliminer au moins la majeure partie des protéines contaminantes, tout spécialement l'albumine, tout en conservant l'activité  
25 lectinique,

- chromatographie sur Séphacryl-S-200,

- chromatographie sur résine échangeuse d'ions telles que DEAE-cellulose ou CM-Trisacryl,

5 - chromatographie d'affinité en utilisant comme ligand un sucre, tel que l'acide N-acétyl neuraminique, la pureté des SCL étant vérifiée par HPLC inverse.

10 Les SCL hautement purifiées sont caractérisées en ce qu'elles apparaissent pratiquement totalement dépourvues d'albumine. Elles donnent un pic unique en HPLC et montrent après chromatographie sur gel SDS et dénaturation trois bandes caractéristiques formées de protéines de taille estimée à 65 kD, 55 kD et  $\leq 14$  kD.

15 L'invention vise tout spécialement la SCL caractérisée par un poids moléculaire de 55 kD environ, tel qu'estimé en SDS-PAGE par comparaison avec des polypeptides de poids moléculaire défini.

20 Elle possède des propriétés structurales et fonctionnelles qui la distinguent du groupe classique des filaments intermédiaires bien qu'elle soit reconnue par un anticorps monoclonal anti-cytokératine mésothéliale de type 7.

25 En effet, elle se présente sous forme monomère, le cas échéant dimère, alors qu'en général les filaments intermédiaires sont polymérisés en tétramères ou plus. Il s'agit d'une protéine extracellulaire, excrétée in vivo comme in vitro alors que les filaments intermédiaires sont intracellulaires ou participent au maintien de la structure.

30 Elle possède des propriétés lectiniques, à savoir une fonction inhibitrice des actions de l'IFN, la capacité de stimuler la synthèse cellulaire et celle

d'agglutiner des cellules. Ces propriétés sont essentiellement conférées par l'extrémité 5', comme en témoigne la digestion par la pepsine qui peut abolir la fonction stimulatrice de la synthèse de l'ADN, avec  
5 conservation de la taille et de la sédimentation en SDS-PAGE.

En fournissant une SCL hautement purifiée, l'invention permet d'une part de caractériser la molécule, d'autre part d'obtenir des anticorps  
10 suffisamment purs pour caractériser la structure antigénique des SCL.

L'invention vise également des procédés d'obtention des séquences de nucléotides et des SCL définies ci-dessus.

15 Pour obtenir les séquences de nucléotides, on peut opérer, selon les techniques classiques, par voie de synthèse. En variante, en particulier pour obtenir au moins une partie des séquences du type SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N° 2, on procède au criblage d'une banque d'ADNc à  
20 l'aide de sondes spécifiques, telles que des anticorps dirigés contre la protéine purifiée de 55 kD évoquée ci-dessus et décrite plus en détail dans les exemples, ou d'ARNm. Les séquences recherchées sont isolées, le cas échéant modifiées comme souhaité, selon les applications  
25 envisagées, et soumises à un ou plusieurs traitements de purification.

Pour obtenir les SCL de l'invention, ces séquences sont avantageusement introduites dans un

vecteur d'expression approprié, sous le contrôle d'un promoteur, aux fins de transfection d'une cellule hôte.

En appliquant les conditions requises pour obtenir l'expression de la SCL recherchée à activité  
5 lectinique, on obtient la synthèse de cette dernière, et, après lyse des cellules ou simplement après excrétion, on la récupère, sous forme recombinante, et on la soumet à au moins une étape de purification.

Pour la production des SCL, on utilisera des  
10 systèmes procaryotes, comme les bactéries, ou eucaryotes comme les cellules d'insectes (système Baculovirus) ou encore les levures, avantageusement telles que disponibles dans le commerce. On peut également employer des cellules animales comme celles de hamster CHO ou de  
15 primates transfectées avec le gène approprié.

Les SCL de l'invention peuvent être également obtenues par voie de synthèse.

Les procédés décrits ci-dessus permettent la purification des molécules de SCL tout en conservant  
20 leurs propriétés biologiques.

L'invention vise en particulier un procédé d'obtention de SCL de degré de pureté élevé, à partir d'extraits tissulaires, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes de traitement de l'extrait tissulaire  
25 contenant des lectines par de la pepsine, de manière ménagée, ou à pH acide, suivi de chromatographies dans des conditions permettant d'éliminer au moins la majeure partie des protéines contaminantes, tout particulièrement l'albumine, tout en conservant l'activité lectinique.

30 Ces étapes de chromatographies comprennent



- le passage de l'extrait tissulaire pré-traité sur Séphacryl S-200,

5       - la récupération de la fraction renfermant l'essentiel de l'activité lectinique, telle que mesurée par le test d'agglutination cellulaire;

- la passage de cette fraction sur des résines échangeuses d'ions, en particulier de la DEAE-cellulose et du CM-Trisacryl,

10       - le passage de la fraction renfermant l'essentiel de l'activité lectinique, sur une colonne renfermant comme ligand un sucre tel que l'acide N-acétyl neuraminique.

15       Cette succession d'étapes apporte une solution technique au problème de la séparation de l'albumine contaminante et permet de l'éliminer en dépit de la taille voisine de celle de SCL, de certaines propriétés physico-chimiques proches de celles de SCL, ainsi que des interactions possibles entre l'albumine et SCL.

20       L'étape de traitement de l'extrait tissulaire est réalisée à l'aide de pepsine, en opérant dans des conditions ménagées. Les concentrations respectives sont de l'ordre de 4 à 8 %, de préférence d'environ 6 % pour l'extrait tissulaire et de 0,5 à 2 mg/ml, de préférence d'environ 1 mg/ml pour une pepsine ayant une activité de  
25       l'ordre de 2500 à 2700 unités/mg.

Des conditions de traitement de l'extrait tissulaire qui se sont révélées avantageuses correspondent à une incubation du mélange réactif à 37°C

environ, pH 2, durant environ 1 h 30 à 2 h 30, en particulier pendant 2 h.

On stoppe alors l'activité enzymatique en augmentant le pH à une valeur voisine de la neutralité.

5 L'extrait ainsi traité est soumis à une succession d'étapes de chromatographies.

#### 1 - Chromatographie sur Séphacryl

De préférence, cet extrait est auparavant centrifugé, et le surnageant est soumis à une filtration  
10 sur un gel de Séphacryl S-200. Les fractions actives sont récupérées en éluant avec une solution tampon telle que PBS, à raison de 15 à 25 ml/h.

#### 2- Chromatographie sur DEAE-cellulose

15 Les fractions prélevées sont recueillies et les fractions présentant le maximum d'activité lectinique sont soumises à une chromatographie sur DEAE-cellulose préalablement gonflé et équilibré avec une solution tampon de pH voisin de la neutralité, en particulier de pH de l'ordre de 7,6.

20 L'élution est réalisée avec la solution tampon additionnée d'un sel avec une molarité allant de 0 à 0,5 M représentant un gradient linéaire de pH 7,6 à 4,0. Une vitesse d'élution satisfaisante est de l'ordre de 20 ml/h.

#### 25 3- Chromatographie sur CM - Trisacryl

Les fractions actives récupérées sont chromatographiées sur CM-Trisacryl équilibré dans un

tampon de pH 4,2, en particulier un tampon acétate de sodium 0,04 M.

De préférence, les fractions actives sont au préalable dialysées contre le tampon acétate, puis déposées sur la colonne de CM-Trisacryl, rincée avec ce même tampon.

Pour éliminer l'albumine, on utilise un premier tampon de pH 5, 0,1 M, ce qui peut être réalisé en 1 h. L'utilisation d'un deuxième tampon, de pH 4,2, 1 M, permet d'éluer la majorité des SCL. Cette opération peut être réalisée en une vingtaine de minute. Avant la mise en contact des fractions actives avec un sucre, on procède avantageusement à une dialyse pour éliminer les molécules dialysables en utilisant un tampon phosphate Na 0,01 M, pH 7,2.

4- Chromatographie d'affinité utilisant comme ligand un sucre :

Le sucre constitue le ligand d'une colonne de chromatographie d'affinité de gel d'agarose, notamment d'hexaméthylène-diamine polyacrylamide-agarose.

Le gel est tout d'abord lavé avec un tampon 0,5 M, par exemple de NaCl, puis de l'eau distillée et finalement centrifugé à basse vitesse de manière à se débarrasser des substances non adsorbées. Une solution de sucre, de pH 4, par exemple d'acide N-acétyl neuraminique 0,1 M, est ajoutée au gel, suivie de celle d'un agent tel qu'un carbodiimide.

D'une manière avantageuse le pH est maintenu à une valeur de l'ordre de 4,5 et 5 à la température ambiante durant environ 1 h, puis est soumis à agitation douce de 10 à 15 heures.

5           Le gel est lavé plusieurs fois afin d'éliminer les impuretés non retenues.

On a recours par exemple à NaCl 1 M, puis à de l'acide acétique 0,1 M, et enfin à de l'eau bi-distillée.

10           La colonne remplie avec cette préparation est équilibrée à pH 7,2. L'utilisation d'un tampon de phosphate de sodium 0,01 M s'avère appropriée.

L'échantillon actif de l'étape précédente est déposé sur la colonne et avantageusement est équilibré au préalable avec le tampon phosphate.

15           Après rinçage de la colonne avec ce tampon, on réalise l'élution avec au moins deux tampons, l'un pour éluer la SCL, l'autre pour éliminer les autres protéines et régénérer la colonne.

20           Le premier tampon (I) est avantageusement constitué par une solution de phosphate de sodium 0,01 M pH 7,2 contenant NaCl 0,15 M. Il conduit à l'obtention d'un pic qui contient la majorité de la SCL. Le deuxième tampon (II) renferme en outre de l'éthylène-glycol, notamment à raison de 40 à 60 % environ, de préférence  
25           de 50 %. Il conduit à un autre pic qui contient la majorité des impuretés.

La colonne est alors rincée avec le tampon de phosphate de sodium.

## 5 - Contrôle de pureté

La SCL récupérée est analysée en HPLC en utilisant un système classique eau/acétonitrile/acide trifluoroacétique et la fraction correspondant au pic principal est ensuite analysée en SDS-PAGE.

L'invention donne ainsi les moyens d'isoler des produits de très haute pureté, et de disposer d'un produit débarrassé pratiquement totalement d'albumine.

L'étude des SCL purifiées ainsi obtenues et des SCL correspondant aux produits d'expression des séquences de nucléotides définies plus haut montre qu'elles possèdent des propriétés lectiniques de grand intérêt.

1. Ces SCL n'agissent pas directement sur les interférons, mais inhibent la synthèse des protéines effectrices secondaires induites par les interférons.

Le nombre de ces protéines effectrices induites est variable d'une isoforme d'interféron à l'autre. Par ailleurs, la même forme moléculaire n'induit pas nécessairement les mêmes protéines effectrices d'une cellule à l'autre. En inhibant la synthèse de toutes les protéines secondaires IFN-dépendantes, les SCL restituent à la cellule son état initial. De ce fait, les cellules récupèrent leur capacité à répondre à des stimuli de croissance, qui autrement serait inhibée par les interférons.

2. La stimulation directe de la croissance est obtenue en l'absence de sérum et intéresse un grand nombre de cellules, immuno-compétentes ou non. Cette

stimulation est obtenue sans effet de rétro-inhibition qui aboutit au développement de l'état réfractaire des cellules aux inductions répétées de cette substance.

De ce fait, contrairement aux immunostimulants habituels, les SCL de l'invention peuvent être administrées d'une façon répétée, le cas échéant en association avec des facteurs de croissance spécifiques, avec lesquels elles peuvent agir en synergie. Un exemple est l'interleukine 2 (Il 2), qui ne peut stimuler la prolifération des lymphocytes T, à moins que ces lymphocytes ne soient activés au préalable par une lectine ou un autre antigène. La sarcolectine pourrait alors jouer un rôle d'activateur physiologique des récepteurs de l'Il 2. Dans d'autres exemples, la sarcolectine sera associée à différentes interleukines ou facteurs de croissance en vue d'une amplification ciblée de la croissance, grâce à la synergie résultante.

3. Le mécanisme de la carcinogenèse semble être au moins en partie clarifié. On admet en général que la transformation maligne résulte d'un processus qui, par étapes successives, à partir de la prolifération bénigne, aboutirait à la sélection de cellules hautement cancérigènes. Les proto-oncogènes sont des gènes qui interviennent dans le processus normal de la prolifération, soit en tant que facteur de croissance, soit en tant que récepteur correspondant, ou alors en intervenant dans la chaîne métabolique impliquée dans le processus de croissance. Les SCL de l'invention, tout spécialement les SCL correspondant à SEQ ID N° 3 ou SEQ ID N° 4, ou les séquences dérivées, interviennent dans l'initiation de la synthèse de l'ADN cellulaire préparant l'action des facteurs de croissance spécifiques. En

particulier, la SCL de 55 kD décrite ci-dessus est une glycoprotéine constitutive qui est excrétée dans le milieu extracellulaire, et stimule la croissance de façon non spécifique. Comme l'effet des sarcolectines et des facteurs de croissance est additif, on peut la considérer  
5 comme un co-oncogène, d'une part par son action propre sur la prolifération cellulaire et sa synergie avec les facteurs de croissance, d'autre part, par son effet inhibiteur des fonctions antiprolifératives des  
10 interférons. Comme pour toutes les lectines, les fonctions biologiques de la sarcolectine sont inhibées par des sucres spécifiques.

Compte-tenu des propriétés rapportées ci-dessus, l'invention vise plus spécialement les  
15 applications suivantes des SCL.

Ainsi, l'invention vise leur utilisation comme co-facteurs de croissance, pour contribuer à la croissance des tissus, en particulier pour contribuer à la régénérescence des tissus lésés et à l'accélération  
20 des cicatrisations.

Ils constituent à cet égard des agents thérapeutiques de grande efficacité, d'application locale ou générale.

En tant que facteurs de croissance, ils sont  
25 utilisables pour les cultures cellulaires in vitro.

En effet, lorsqu'on cultive des lymphocytes fraîchement prélevés chez un individu sain, on peut stimuler leur prolifération en présence d'interleukine 2.

5       Après passages successifs dans le milieu H1 sans sérum, les cellules se répliquent en présence de seulement Il2. Mais la seule protéine excrétée dans le milieu est la SCL, sous une forme dimérique.

10       Dans les lignées T continues H9, la multiplication cellulaire est assurée par la SCL fabriquée par les cellules et excrétée. En effet, dans les deux cas, c'est la seule protéine majeure détectée dans le milieu par SDS-PAGE et Western blot.

15       Des essais réalisés en ajoutant la SCL en quantité appropriée montrent son effet favorable sur la croissance des cellules.

20       L'invention vise donc également l'utilisation des SCL comme agents thérapeutiques de stimulation du système immunitaire, en particulier comme stimulant de l'immunité spécifique, le cas échéant les SCL en association avec un antigène, par exemple avec un facteur de croissance comme l'interleukine.

25       Ainsi, en tant qu'activateurs physiologiques de la prolifération des lymphocytes T, les SCLs peuvent activer la synthèse des récepteurs pour les interleukines (Ils), en particulier les Il2. L'expression continue des SCL dans la cellule apparaît inhiber l'état réfractaire des cellules aux inductions répétées d'interféron, conduisant à une production continue d'interféron à chaque induction avec toutefois une incapacité des  
30       cellules d'exprimer des fonctions IFN.



L'invention vise en particulier leur utilisation dans des traitements à l'interféron en mettant à profit leur effet inhibiteur de la synthèse des protéines effectrices secondaires de manière à restituer  
5 à la cellule son état initial et la sensibilité normale à l'interféron.

Les SCL sont ainsi avantageusement mises en oeuvre dans des protocoles d'administrations répétées d'IFN, pour traiter des états pathologiques d'origine  
10 infectieuse, par exemple au cours des phases finales des infections du SIDA ou au cours des maladies auto-immunes, comme le lupus erythémateux.

Les SCL de l'invention peuvent être également utilisées comme adjuvants de vaccination, en raison de  
15 leur capacité à augmenter la prolifération des cellules immuno-compétentes.

Selon un autre aspect, l'invention vise l'utilisation des SCL de l'invention en tant qu'outils pour rechercher des composés inhibiteurs des  
20 sarcolectines naturelles.

En particulier, l'invention vise l'utilisation des SCL pour sélectionner des composés inhibiteurs de leur activité lectinique, tels que des sucres ou des amino-acides butyriques.

25 Les médicaments élaborés à partir de ces composés inhibiteurs, qui renferment des quantités efficaces de ces composés pour obtenir l'inhibition recherchée, en association avec des excipients

pharmaceutiques, entrent également dans le champ de l'invention.

Les sucres inhibiteurs sont des sucres simples ou composés, tels la N-acétyl galactosamine, le galacturonate de sodium, l'acide N-acétyl neuraminique, le lactose alpha ou bêta, la neuramine-lactose.

Les amino-acides butyriques comprennent l'acide alpha-amino butyrique, l'acide alpha-amino isobutyrique et l'acide gamma-amino butyrique (GABA).

Grâce à ces inhibiteurs, les productions antiphysiologiques excessives ou continues des interférons peuvent être ré-équilibrées (en inhibant l'action des SCL) pour lutter contre les désordres immunitaires induits par certaines infections virales chroniques (HIV), ou maladies immunitaires.

Les composés inhibiteurs permettent d'augmenter considérablement la résistance antivirale induite par l'IFN et sont utilisés avec avantage dans des protocoles comportant des traitements aux IFNs. Ils sont également utilisables dans des thérapies anti-cancéreuses.

L'invention vise en particulier l'utilisation de ces inhibiteurs dans de tels traitements en association avec des immuno-modulateurs comme le Corynebacterium parvum, que la SCL peut remplacer.

A l'inverse, d'autres produits capables d'inhiber l'activité des SCL de l'invention sont constitués par des anticorps. Ces anticorps, polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre les SCL de l'invention, sont produits avantageusement selon les méthodes

classiques. Ils sont également visés par l'invention en tant que produits nouveaux.

5 En thérapeutique, les anticorps anti-SCL de l'invention constituent des agents particulièrement précieux pour inhiber les effets des SCL produites en excès dans des états pathologiques comme les cancers, les maladies virales chroniques ou auto-immunes.

10 Les médicaments élaborés à partir de ces anticorps sont caractérisés en ce qu'ils contiennent une quantité efficace de ces anticorps pour les applications envisagées, en association avec un véhicule pharmaceutique inerte.

Ces médicaments sont spécialement appropriés pour les traitements anti-tumoraux.

15 Dans les différentes applications thérapeutiques évoquées ci-dessus, les SCL sont, le cas échéant, fixées à de l'albumine à des fins de stabilisation, ou pour faciliter leur diffusion dans les tissus et l'expression de leurs fonctions.

20 En diagnostic, ces anticorps sont utilisables pour toutes les réactions immunologiques, en particulier les ELISA et Western Blots, et permettent de déterminer qualitativement et quantitativement la présence de SCL dans un extrait biologique prélevé chez un patient.

25 L'invention vise ainsi une méthode pour détecter in vitro les SCL, et tout spécialement la SCL de 55 kD telle que purifiée selon les méthodes décrites

plus haut, ou correspondant à la protéine exprimée par SEQ ID N° 1, ou encore obtenue par voie de synthèse.

Cette méthode comprend :

5                   - la mise en contact d'un échantillon biologique à analyser provenant d'un patient ou de cellules avec une préparation d'anticorps anti-SCL ou d'un fragment Fab immobilisé sur un support solide dans des conditions appropriées pour la production d'un  
10                   complexe antigène-anticorps avec les SCL lorsqu'elles sont présentes dans l'échantillon ou les cellules, puis

                  - la mise en évidence de la formation d'un tel complexe de type antigène-anticorps, en opérant avantageusement selon les techniques habituelles.

15                   On a recours par exemple à des techniques de cytofluorométrie.

                  Cette méthode de détection permet de révéler ave une grande sensibilité et rapidement la présence de SCL dans l'échantillon testé, la révélation de la  
20                   réaction éventuelle de type antigène-anticorps.

                  L'invention vise également un kit utilisable pour réaliser une telle détection. Ce kit est caractérisé en ce qu'il comprend :

25                   - une phase solide appropriée servant de support

                  - une préparation d'anticorps anti-SCL ou de fragments Fab, libres ou immobilisés,

- des solutions tampons et réactifs appropriées pour les réactions immunologiques et pour les réactions de détection.

5 En variante, la détection porte sur la présence de gènes codant pour les SCL et comprend

- la réalisation de l'étape de mise en contact de l'échantillon biologique à analyser ou de cellules provenant d'un patient avec une sonde comme défini plus haut, dans des conditions appropriées pour la production  
10 d'un complexe d'hybridation, lorsque les gènes codant pour les SCL sont présents dans l'échantillon ou les cellules,

- la mise en évidence du complexe d'hybridation et la quantification de l'expression des SCL par ces  
15 gènes.

L'invention vise également un kit utilisable dans cette méthode et comprend lesdites sondes ainsi que les solutions tampons et réactifs utiles pour réaliser la réaction d'hybridation.

20 D'autres inhibiteurs encore des SCL de l'invention sont constitués par les séquences de nucléotides anti-sens définies ci-dessus. Ces anti-sens permettent de bloquer l'expression de SCL, par exemple dans le cas de sarcomes ostéogéniques.

25 D'autres applications encore des SCL selon l'invention sont basées sur leur capacité à agglutiner les cellules et leur affinité pour les sucres simples.

Ces propriétés sont mises à profit en diagnostic ou en thérapeutique.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention seront donnés dans les exemples qui suivent.

5 Il y est fait référence aux figures 1 à 5 qui représentent respectivement

10 - la figure 1, le profil d'élution des fractions de SCL chromatographiées sur DEAE-cellulose, obtenues après chromatographie sur Séphacryl d'extraits tissulaires traités au préalable,

- les figures 1A et 1B, les profils d'élution sur CM-Trisacryl des fractions biologiquement actives de SCL recueillies sur DEAE-cellulose,

15 - les figures 2A et 2B, les profils d'élution des fractions obtenues par chromatographie avec comme ligand un sucre et l'analyse en HPLC inverse de la fraction active,

20 - les figures 3A et B, le contrôle par un gel SDS-PAGE des différentes étapes de la purification et le Western blot utilisant des anticorps anti-65kD et anti-55kD.

25 - les figures 4A et 4B, une photo de l'électrophorèse SDS-PAGE d'une préparation de SCL avant et après traitement ménagé par la pepsine et d'un Western blot montrant la réaction d'anticorps monoclonaux anti-65kD respectivement avec la protéine de l'invention et l'albumine, et

- la figure 5, la photo d'un Western blot utilisant l'anticorps anti-55kD pour étudier différents échantillons.

EXEMPLE 1 : PROCEDURE DE PURIFICATION DE SARCOLECTINE

5 Le schéma de cette procédure est le suivant :

Etape I - Préparation du matériel biologique et lyophilisation.

Etape II - Hydratation du matériel et prétraitement soit à la pepsine, soit à pH 5.

10 Etape III - Chromatographie sur Séphacryl S-200.

Etape IV - Chromatographie sur résine échangeuse d'ions : DEAE-cellulose ou CM-Trisacryl

Etape V - Chromatographie d'affinité sur sucre.

15 Etape VI- Chromatographie en HPLC phase inverse (pour séquençage) :

colonne C18 gradient H<sub>2</sub>O/acétonitrile

colonne C4 gradient H<sub>2</sub>O/acétonitrile

I) Préparation du matériel biologique et lyophilisation

20 Les tissus prélevés sont lavés soigneusement dans du milieu minimal de Eagle jusqu'à l'élimination de toute trace de sang, puis sont lyophilisés et conservés à l'état sec à -20°C. Le tissu sec est ensuite coupé finement jusqu'à l'obtention d'une poudre qui est pesée,  
25 hydratée dans du milieu MEM (additionné d'antibiotiques) à la concentration de 6 % (poids sec en g). La suspension est agitée à +4°C pendant 20 h, centrifugée à

basse vitesse 4000 rpm pendant 20 min pour clarification, puis centrifugée à 27 000 rpm pendant 2 h à 90 000 g (on utilise avantageusement une ultracentrifugeuse Spinco L3).

5 Le surnageant qui renferme la sarcolectine est récolté après filtration sur gaze stérile et sur filtre millipore 1,2  $\mu$ , distribué en piluliers de 2,5 ml, puis lyophilisé avant stockage à -80°C.

#### II) Hydratation du matériel et prétraitement

10 Au moment de l'utilisation, le produit lyophilisé est hydraté dans 2,5 ml d'eau bidistillée, puis bien dissous.

La préparation est alors soumise soit à un traitement par la pepsine, soit à un traitement à pH 5  
15 (point isoélectrique de la SCL).

##### A) Traitement par la pepsine

Il a été constaté qu'un traitement ménagé par la pepsine permet de conserver les caractéristiques physico-chimiques (migrations dans le gel), et ne  
20 détruit pas l'activité biologique des extraits tissulaires, mais détruit d'autres protéines contaminant les préparations.

Les extraits tissulaires (concentration 6 %) sont traités par une solution de pepsine cristallisée 2  
25 fois (2 675 unités/mg) à la concentration finale de 1 mg/ml. Le mélange réactif est ajusté à pH 2 (pH optimal de l'activité pepsique) et incubé à 37°C pendant 2 h ; un précipité important se forme. L'action enzymatique est alors stoppée par ajustement du pH à 7,3 et addition  
30 d'Iniprol (Choay)  $10^5$  unités/mg protéase, une nuit à 4°C.



L'échantillon est centrifugé et le surnageant prélevé est alors filtré sur gel Séphacryl S-200.

*B) Traitement à pH 5*

La préparation d'extrait tissulaire est ajustée à pH 5 par addition de HCl 1N, puis laissée à la température de la pièce pendant 15 min. Un précipité important apparaît qui est centrifugé à 4 000 rpm pendant 15 min. Le surnageant une fois décanté représente l'échantillon pour l'étape de filtration sur gel Séphacryl S-200.

III ) Chromatographie sur Séphacryl S-200

On utilise une colonne (Pharmacia 2 x 30 cm) qui contient le gel Séphacryl S-200 (Pharmacia) préalablement gonflé dans du tampon . L'échantillon est introduit dans la colonne sous un volume de 2,5 ml, la vitesse d'écoulement de l'éluant (PBS) est de 20 ml par heure et le volume de chaque fraction est de 1,35 ml. La détermination du poids moléculaire de l'échantillon filtré est calculé par référence à une gamme de protéines de poids moléculaires connus.

L'estimation du poids moléculaire est basée sur la relation linéaire existant entre le volume effluent ( $V_e$ ) et le logarithme du poids moléculaire.

L'activité biologique (capacité d'agglutination des cellules) de chaque fraction est ensuite testée. Le volume effluent de la fraction, qui présente le maximum d'activité biologique, permet, après report sur la courbe d'étalonnage, de déterminer le poids moléculaire qui se situe entre 190 et 200 kDa.

#### IV) Chromatographie sur résine échangeuse d'ions

##### . DEAE cellulose

Une colonne est remplie de diéthylaminoéthyl-cellulose (DEAE 52, Whatman, England) préalablement gonflé et équilibré dans le tampon pH 7,6 suivant : NaCl 20 mM, EDTA 0,1 mM,  $\beta$ -mercapto-éthanol 15 mM, tris-acide acétique 20 mM. L'échantillon (pool des fractions biologiquement actives obtenues après filtration sur Séphacryl S-200) est introduit dans la colonne qui est alors soigneusement rincée avec le même tampon.

Les protéines sont éluées pendant 4 h en présence de tampon additionné de NaCl de molarité variant de 0 à 0,5 M représentant un gradient linéaire de pH 7,6 à 4,0. La vitesse d'élution est de 20 ml/heure. Le profil enregistré est représenté sur la figure 1. Le pic III contient de l'albumine et des traces de SCL, alors que le pic IV (hachuré) correspond à l'activité biologique et contient la majorité de la SCL. Cette dernière est éluee avec un tampon sodique 0,25 M.

Cette étape peut être remplacée par une chromatographie sur colonne Mono Q en HPLC (gradient L-histidine 20 mM pH 5,5 - 6,0 / NaCl 1M).

##### . CM-Trisacryl

Une colonne Pharmacia (1 x 15 cm) est remplie de CM-Trisacryl-M (IBF, France) puis équilibrée dans du tampon acétate de sodium 0,04 M pH 4,2.

L'échantillon contenant les fractions actives de sarcolectine est préalablement dialysé contre le tampon acétate 0,04 M pH 4,2 puis déposé sur la colonne

qui est alors rincée avec le même tampon acétate pendant 1 h.

Le profil d'élution comprend deux tampons :

5 — le premier tampon : acétate de sodium 0,1 M, pH 5 qui élimine en majorité l'albumine ; l'élution dure environ une heure ; (voir figure 1 A où le pic 15 contient de l'albumine et le pic 50 (pic hachuré) la SCL exprimées en activité cytoagglutinante (CA)).

10 — le deuxième tampon : acétate de sodium 1 M pH 4,2 qui élue en majorité la sarcolectine ; l'élution dure 20 minutes (4 min./fraction) (voir figure 1B)

Les fractions 40-50 contiennent la sarcolectine et sont dialysées contre le tampon phosphate Na 0,01 M pH 7,2 qui servira pour l'étape suivante.

15 V) Chromatographie d'affinité, utilisant comme ligand l'acide N-acétyl-neuraminique (N.A.N.A. en abrégé).

20 9 ml d'Ultragel-HMD-Aca 34, IBF code 2461 61 (hexaméthylène-diamine polyacrylamide-agarose) sont lavés 3 à 4 fois dans 25 ml de tampon NaCl 0,5 M, puis 2 fois au moins avec de l'eau bi-distillée et finalement centrifugés à basse vitesse.

25 4 ml d'une solution d'acide N-acétyl-neuraminique (type IV, Sigma) 0,08 M ajustée à pH 4,7 sont ajoutés au gel.

On ajoute alors 5 ml EDCL 0,1 M pH 6 (1-éthyl-3-3-diméthyl-amino-propyl-carbodiamide, Sigma) et on maintient le pH entre 4,5 et 5 pendant 1 h à la température du laboratoire. On laisse ensuite sous

agitation douce pendant une nuit. Le gel est lavé plusieurs fois avec NaCl 1 M, puis avec 2 volumes d'acide acétique 0,1 M, et rincé avec de l'eau bi-distillée. On remplit une colonne Pharmacia (1 x 15 cm) avec cette préparation et on équilibre avec le tampon phosphate Na 0,01 M pH 7,2. On introduit l'échantillon de sarcolectine préalablement équilibré contre le tampon phosphate Na, et on le recycle trois fois. Après rinçage de la colonne avec le même tampon pendant 1 h, on élimine les impuretés non retenues puis on réalise l'élution avec deux tampons :

— le tampon E<sub>1</sub> = phosphate de sodium 0,01 M pH 7,2 + NaCl 0,15 M qui élue la sarcolectine (pic hachuré sur la figure 2A) comme l'indique l'enregistrement en D.O. et le titrage de l'activité biologique (agglutination des cellules en opérant comme décrit dans (8)) ;

— le tampon E<sub>2</sub> = phosphate de sodium 0,01 M pH 7,2 + NaCl 0,15 M + 50 % éthylène-glycol pour éliminer les autres protéines (pic entre 15 et 20) et régénérer la colonne.

La colonne est alors rincée avec le tampon phosphate de sodium 0,01 M pH 7,2. (Fig. 2A)

#### VI) Chromatographie en HPLC phase inverse

L'appareil utilisé est un "HPLC Controller 2152" de marque LKB et la séparation sur phase inversée est réalisée avec une colonne C18 (Waters).

On a recours au système classique eau/acétonitrile/acide trifluoro-acétique 0,1 %, avec détection à 220-280 nm.

Le gradient est programmé comme suit :

Temps	Débit	% acétonitrile
0	1 ml	0
40	1 ml	50
60	1 ml	80
70	1 ml	80
80	1 ml	0

Un pic majeur situé à 75 % du gradient d'acétonitrile est enregistré (figure 2B)

La fraction SDS-PAGE correspondante est analysée en gel SDS-PAGE. Le Western blot montre les trois bandes en utilisant le sérum anti-55kD : à 65 kD, 55 kD et  $\leq 14$  kD. L'utilisation du sérum anti-65kD est entravée par le fait qu'elle est constamment contaminée par l'albumine.

#### RESULTATS OBTENUS

Les différentes étapes de la purification sont suivies par rapport à deux fonction caractéristiques des SCL, à savoir leur capacité 1) de stimuler la synthèse de l'ADN dans des cellules T H9 humaines, cultivées dans un milieu dépourvu de sérum pendant 24h et 2) d'agglutiner des cellules. On rapporte dans le tableau 1 les résultats pour les 3 dernières étapes de purification en indiquant le comptage par minute (CPM) de thymidine  $^3\text{[H]}$  le pourcentage de stimulation et l'agglutination cellulaire (unité / 0,05 ml).

TABLEAU 1

Etape de purification	CPM $^3\text{(H)}$ Thymidine	Stimulation (%) de la synthèse d'ADN	Agglutination des cellules Unité / 0.05 ml
DEA Cellulose	$6.723 \pm 717$	63.5	16
CM - Trisacryl	$10.525 \pm 1.833$	155.8	16
NANA aff. chrom.	$8.636 \pm 1.791$	111.1	16
Cellules H9 témoin	$4.141 \pm 717$	-	-

L'examen de ces résultats montre que les trois dernières étapes de la purification aboutissent à l'obtention d'une protéine pratiquement pure.

5           Rapporté au taux de protéine initial, la purification est de l'ordre de 16 500 fois. La protéine purifiée obtenue à l'issue de la procédure décrite ci-dessus donne un pic unique après analyse en HPLC.

10           Quant à la capacité d'agglutiner ces mêmes cellules, on constate qu'elle reste inchangée. Après chromatographie en gel SDS-PAGE coloré par le nitrate d'argent et dénaturation, on observe trois bandes caractéristiques dont la taille a été estimée successivement à 65 kD, 55 kD et  $\leq 14$  kD. (Voir piste 7  
15 sur la figure 3A, où les autres pistes correspondent aux différentes étapes de la purification contrôlées par SDS-PAGE, à savoir les chromatographies 1) sur Séphacryl S200, 2) sur DEAE-cellulose, 3) sur CM-Trisacryl (le pic 1 de l'albumine), 4) correspond à un repère de taille, 5)  
20 à la chromatographie sur CM-Trisacryl, (le pic 2 de SCL), 6) à la chromatographie d'affinité NANA et 7) à la HPLC).

Ces bandes ont été découpées, lyophilisées, broyées et injectées à des lapins pour immunisation.

25           En raison de la proximité de leur taille et de leurs propriétés physico-chimiques proches, le sérum anti-65 kD réagit également avec l'albumine. Par contre, le sérum anti-55 kD paraît être complètement homogène. Aussi bien le sérum anti-65 kD que celui anti-55 kD reconnaissent les protéines des deux autres poids

moléculaires, après analyse par les Western blots (figure 3B, où les pistes 1 et 3 correspondent à l'utilisation d'anticorps anti-65 kD et les pistes 2 et 4, à celle d'anticorps anti-55 kD).

5                    EXEMPLE 2 : METHODE DE PURIFICATION RAPIDE

Une purification rapide peut être obtenue pour certains extraits biologiques, à des fins diagnostiques (par exemple, sérum dilué au dixième) en procédant comme suit :

10                    - Abaissement du pH du milieu à pH 5 pendant 30 minutes ;

                    - On note alors un précipité important, qui sera éliminé par centrifugation;

15                    - Réajustement à pH 7,4 ; le surnageant contient les protéines 65 et 55 kD reconnaissables par les Western blots à l'aide d'anticorps spécifiques. Le titre peut être estimé par ELISA en utilisant les mêmes anticorps.

20                    In vivo on trouve des SCLs pour une part fortement liées à l'albumine, notion qui a été ignorée jusqu'à présent. En utilisant des anticorps monoclonaux, des bandes clairement détectables de cette protéine peuvent être retrouvées par Western blot (voir figure 4A: SDS-PAGE électrophorèse colorée par le bleu de Comassie

25                    - Sous la bande majeure de 67 kD contenant l'albumine, on trouve une bande mineure de 65 kD. Le traitement ménagé de la préparation par la pepsine digère l'albumine, mais conserve la bande mineure, figure 4B : le Western blot utilisant la même préparation marque intensément la bande

30                    mineure de 65 kD. On note la diffusion du marqueur sur l'albumine qui n'est qu'indirectement marquée par la protéine de 55 kD.



De même en utilisant des milieux de cultures qui permettent la croissance des cellules sans sérum, une bande de protéine unique identifiée comme étant la SCL est détectée, excrétée des cellules : simiennes Vero, des sarcomes ostéogéniques humains, des lymphocytes T du PBL ou des cellules H9 en culture continue. Dans ces cultures pauvres en protéines, la SCL doit jouer un rôle important dans la régulation de la croissance.

10 ~~EXEMPLE 3~~ : CLONAGE ET IDENTIFICATION DU GENE DES  
SARCOLECTINES HUMAINES

On utilise une banque de d'ADNc d'origine commerciale provenant de placenta humain de 34 semaines. Ces ADNc ont été clonés dans le site EcoRI du gène galactosidase du phage lambda gt 11.

La sélection a été faite en utilisant en parallèle des anticorps anti-sarcolectine obtenus séparément contre la protéine 65 kD et la protéine 55 kD comme décrit dans l'exemple 1. En résumé, les bandes ont été isolées et excisées, lyophilisées, et concassées pour être ensuite utilisées pour immuniser des lapins.

Le sérum anti-65 kD reconnaît la protéine correspondante et également un peu l'albumine. Par contre, l'anticorps anti-55 kD apparaît spécifique. Les deux anticorps ont été utilisés en parallèle, dans un ordre bien déterminé. Le tableau 2 donne un résumé des méthodes suivies pour isoler 4 clones.

TABLEAU 2

Nombre de sélections				
	1	2	3	4
				C/C
1	1a	2a → 0 2b → 0		
2	1a	2a → 0 2b → 0		
3	1a	2a → 0 2b → 0		
4	1a	2a → 0 2b → 0		
5	1a	2a → 0 2b → 0	3b	4b
6	1a	2a → 0 2b → 0	3b	4b
7	1a	2a → 0 2b → 0		
8	1a	2a → 0 2b → 0		
9	1a	2a → 0 2b → 0	3b	4b
10	1a	2a → 0 2b → 0	3a	4b

a: anticorps anti-65 kD

b: anticorps anti-55 kD

#### . Identification des clones

La banque a été amplifiée pour obtenir environ  $10^5$  à  $10^6$  clones. Les clones vides produisent la galactosidase -1. Ils sont colorés en bleu après traitement IPTG + X-gal. Les gènes clonés sont insérés dans le site EcoRI de la galactosidase et la protéine de fusion ainsi obtenue est incolore. Les colonies incolores sont ensuite traitées par les sérums spécifiques auxquels on ajoute un anti-sérum anti-lapin couplé à la peroxydase révélée par le DAB, qui permet leur révélation.

Comme indiqué dans le tableau 2, 10 clones ont été isolés au cours du premier passage grâce à l'anticorps spécifique (a).

Au cours du deuxième passage, la moitié des descendants de chaque clone isolé a été sous-cloné par l'anticorps anti-65kd (a) et l'autre par l'anticorps anti-55 kd (b)

Cette procédure a permis d'isoler au cours du troisième clonage un clone appelé 5, grâce à l'anticorps b, un clone nommé 6 avec l'anticorps b, un clone 9 avec l'anticorps b et enfin, un clone 10 avec l'anticorps a. Cette procédure a donc conduit à l'isolement au total de 4 clones.

Au quatrième clonage, seuls les anticorps anti-55kd (b) ont été utilisés, et tous les clones obtenus, qu'ils soient isolés par les anticorps (a) ou (b) ont été reconnus par l'anticorps b qui est beaucoup plus spécifique comme indiqué précédemment. L'analyse des séquences montre qu'en réalité 3 clones différents sont isolés, désignés clones 5 et clone 6, car après

séquençage les clones 9 et 10, se sont révélés absolument identiques.

On observera ainsi que ces trois clones ont été isolés avec les deux anticorps différents (a) et (b) : leur identité suggère des rapports antigéniques entre les deux sérums, correspondant à des épitopes partagés par les protéines. Ces protéines peuvent donc représenter des membres d'une famille.

. Résultats obtenus avec le clone 5

#### *Structure et caractérisation du clone*

L'ADNc isolé a une longueur de 1,8 kb. Il contient une phase de lecture ouverte de 1 407 pb qui contient l'information génétique pour 469 acides aminés. Sa structure est donnée sur SEQ ID N°1. Les séquences ATG d'initiation et TGA de terminaison sont respectivement en position 62 et 1469.

#### EXEMPLE 4 : ETUDE DE LA PROTEINE de 55kD

1) Deux sortes de lignées cellulaires provenant de sarcomes ostéogéniques humains de référence (MG 63) ou HOS ont été cultivées. La culture de ces cellules a été réalisée en présence de 1% de sérum fœtal de veau et de milieu RPMI. Les protéines excrétées dans le milieu après purification selon le procédé de l'exemple 1 ont été analysées. Après Western blot, une bande de 65 kD et une bande de 55 kD ont été obtenues. Les deux protéines ont été excrétées dans le milieu de culture.

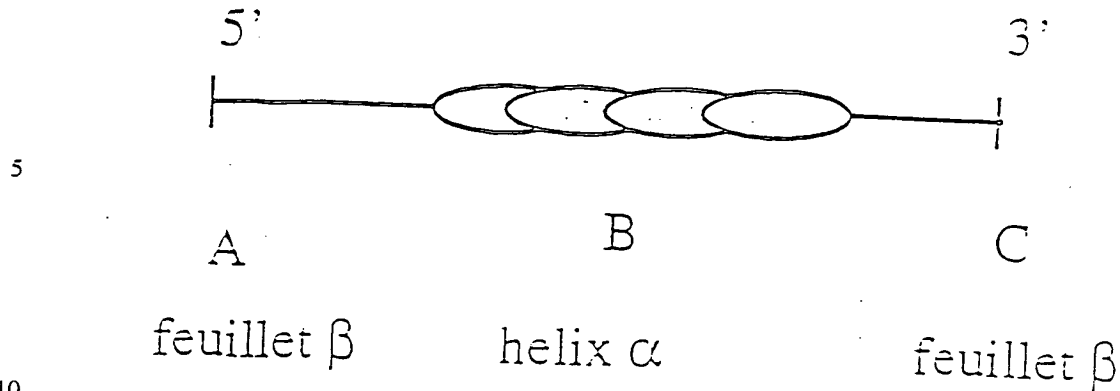
2) Dans une deuxième série d'expériences, ces mêmes cellules ont été cultivées dans un milieu synthétique de Whittaker (Ultra Doma MDCK) sans sérum, pendant deux passages successifs, de façon à éliminer tout albumine résiduelle. Au total, ces milieux ne contiennent que très peu de protéines (2-5 ng/ml). Les cellules excrètent des lectines capables d'agglutiner les cellules H9 (lymphocytes T en lignée continue traités

par 10% de formol). Après Western blot, (utilisant aussi bien des anticorps monospécifiques contre la protéine 55 kD que l'antisérum monoclonal du commerce contre la cytokératine de type 7), une bande unique a été obtenue dans la région 55 kD. C'est la seule bande détectable après SDS-PAGE et coloration par le bleu de Coomassie, reconnue aussi bien par les sérums anti-55 kD, que par les anticorps monoclonaux anti-cytokératine mésothéliale du commerce. Il est possible, donc, que la protéine de 55 kD, peut-être à l'aide de ses fonctions lectiniques, soit capable de se fixer sur l'albumine, donnant ainsi à la SCL une fausse apparence de P.M. plus élevé que réellement.

Cette hypothèse est également étayée par le fait que, dans l'albumine bovine commerciale hautement purifiée (99%), à l'aide de l'antisérum monoclonal du commerce, une deuxième bande d'un P.M. un peu plus faible est détectée. Après traitement de la préparation d'albumine par la pepsine, cette bande persiste, alors que l'albumine est digérée (voir figures 4A et 4B). La relation entre l'albumine et la SCL pourrait être purement fortuite, ou au contraire importante pour la diffusion de SCL dans l'organisme, et pour le maintien de sa stabilité.

3) Dans tous les essais réalisés, la majorité des SCL se retrouvent excrétées dans le milieu de culture, contrairement aux filaments intermédiaires qui sont généralement intracellulaires.

4) Dans l'ensemble, les séquences protéiniques obtenues peuvent être schématisées comme suit:



Le domaine A correspondant à environ 320 pb dans l'ADN est variable ; il est traduit en feuillet  $\beta$  dans la protéine. Cette région contient 12 blocs de 80 à 100 % homologues à ceux retrouvés dans la lectine de 14 kD de la protéine liant le galactoside (140/320 pb). Ce domaine contient la partie essentielle à la fonction lectinique de la molécule. Au total, au moins 30 de ces blocs sont localisés principalement aux extrémités.

Le domaine B est formé de 4 hélices  $\alpha$ . Il possède les homologies suivantes pour l'ADN:

Kératine humaine 56 Kd : homologue à 78 % sur une longueur de 814 pb.

Vimentine humaine : homologue à 52 % sur une longueur de 625 pb

Neurofilament humain : homologue à 55% sur une longueur de 589 pb.

Le domaine C contient des séquences courtes traduites en feuillet  $\beta$  qui possède également des séquences lectiniques.

5) C. Glass et al. (9) ont isolé un gène et ont classé cette molécule comme un filament intermédiaire sous le nom de cytokératine mésothéliale. Cette

identification est basée sur les analogies de séquence citées ci-dessus et qui concernent les séquences hélice  $\alpha$  stables de la molécule.

5 Au contraire, l'invention établit que le segment 5' variable formant le feuillet  $\beta$  contient la fonction lectinique de la molécule. Le domaine stable des quatre hélices  $\alpha$  qui occupent le domaine B semble assurer la stabilité de la molécule. La signification biologique de cette molécule de 55 kD est fondamentalement  
10 différente de celle enseignée par les auteurs précédents pour la molécule qu'ils ont décrite. De plus, la SCL de l'invention, comme indiqué plus haut, est excrétée dans le milieu. Cette propriété est inhabituelle pour les filaments intermédiaires, qui faisant partie du  
15 cytosquelette, ont comme rôle essentiel de contribuer à la stabilité de la structure intracellulaire. Les SCL sont exprimées sous la forme monomérique, ou dans certains cas dimérique. Les filaments intermédiaires sont au contraire polymérisés en multimères.

20 6) Le traitement ménagé par la pepsine à pH 2 de la SCL purifiée détruit la fonction stimulatrice de la SCL, sans modifier ni la migration, ni la taille de la molécule dans le gel SDS-PAGE. De même le pouvoir agglutinant des cellules est conservé. Il est connu en  
25 effet que la pepsine détruit d'abord des sites localisés au niveau de l'extrémité 5' de la molécule (au niveau des amino-acides aromatiques thréonine et tyrosine) expliquant la perte des fonctions biologiques.

## EXEMPLE 5 : ETUDE DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE

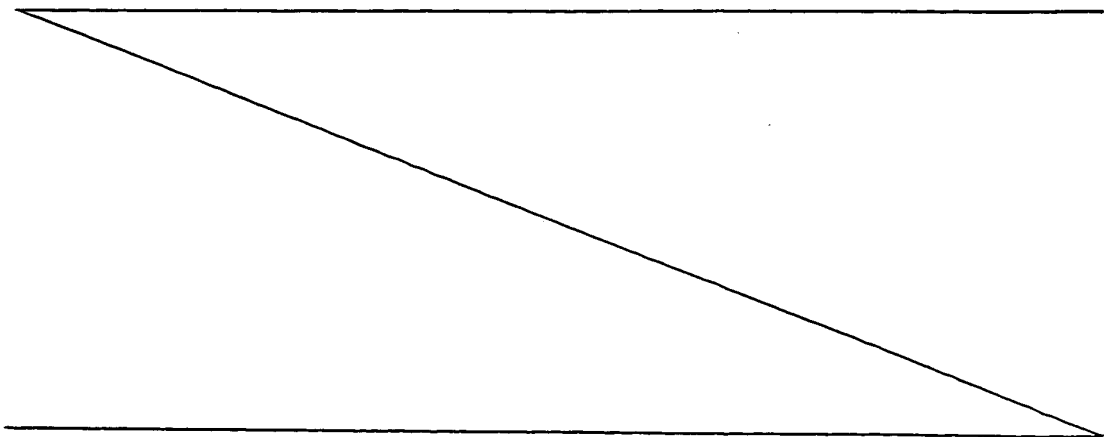
5 I - Etude des effets inhibiteurs de sucres vis-à-vis de SCL

Action des sucres simples sur l'agglutination des cellules.

10 Une grande variété de cellules provenant soit de rongeurs, soit de primates, a été testée. L'agglutination est obtenue en suspendant les cellules dans un milieu MEM en l'absence de sérum. Le test peut être exécuté de deux façons, soit en présence d'une gamme de dilution de sarcolectine en progression géométrique à  
15 base de 2 , en recherchant la concentration à laquelle 50% des cellules sont agglutinées, soit en recherchant l'affinité des différents sucres pour les récepteurs cellulaires.

20 Dans l'exemple présenté, la sarcolectine murine provenant d'ascite liquide de souris suisses greffées par le sarcome TGI80 de Crocker contient 32 unités agglutinant les cellules H9 qui proviennent d'un lymphome T, fixées par le formol 10%.

25 Le tableau ci-dessous illustre l'affinité des récepteurs pour les différents sucres en présence de 2 unités agglutinantes.





D galactose :            affinité 0,28 mM

$\beta$  lactose :                            0,25 mM

$\alpha$  lactose :                            0,125 mM

5            N.A.N.A :                            0,0075 mM

10            Dans le cas de la sarcolectine murine,  
l'affinité est plus élevée pour le  $\beta$  lactose que pour l' $\alpha$   
lactose, alors que l'inverse est observé avec des SCL  
provenant de placenta humain. L'affinité la plus élevée  
pour les tissus humains est le N.A.N.A. D'autres sucres  
inhibiteurs comprennent la N-acétyl-glucosamine ou encore  
le galacturonate (surtout pour les hamsters), étant  
entendu que cette énumération ne présente aucun caractère  
15 exhaustif.

Les sucres inhibiteurs empêchent non seulement  
l'agglutination des cellules, mais entravent également  
les différents effets biologiques des sarcolectines, en  
particulier la stimulation de la croissance.

20            Cet effet sera d'autant plus prononcé que  
l'affinité pour les récepteurs de SCL s'avère plus  
grande.

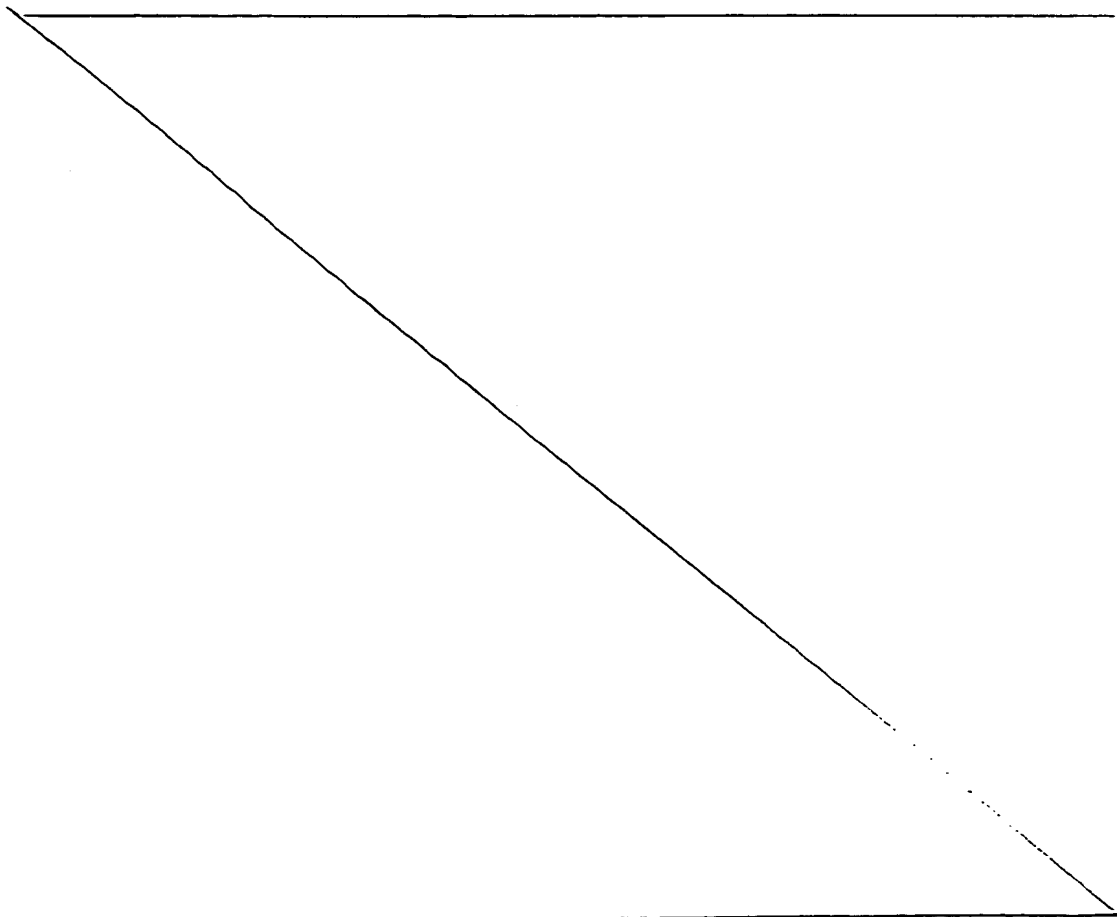
On mesurera donc l'intérêt des SCL de  
l'invention qui permettent de sélectionner des sucres à  
25 effet inhibiteur très élevé et dont on pourra mettre à  
profit l'effet indirect sur la croissance.

Comme déjà souligné, cet effet inhibiteur des  
sucres vis-à-vis des SCL permet d'augmenter les fonctions  
antivirales et antiprolifératives des IFN.

Effets anti-viraux indirects des sucres inhibiteurs

On utilise comme modèle le virus de l'encéphalomyocardite (EMC), qui tue les souris dans pratiquement tous les cas, après des périodes d'incubation assez variées, mais relativement courtes.

On injecte à des souris mâles (poids moyen : 2,5 g, âgées de 8 à 10 semaines), par voie I P du galacturonate de sodium, de la glucosamine et de l'acide N-acétyl-neuraminique (solutions de 5 à 10 % renfermant 100 mM de sucre). 24 h après, cent doses létales (50%) de virus EMC sont injectées par la même voie. Après une heure, l'interféron murin est injecté (à la dose de 20 000 unités dans 0,5 ml). On donne dans le tableau 3 les nombres d'animaux survivants sur le total testé, pourcentage et signifiante statistique.



Protection de l'IFN contre l'effet pathogène du virus  
 Encéphalomyocardite chez la souris Swiss  
 (Nombre d'animaux survivants sur nombre total testé,  
 pourcentage et signifiante statistique [\*])

Galacturonate de Na			
	+MEM	+IFN	
	6/75	22/90a	24%
		8%	
Glucosamine			
	+MEM	+IFN	
	1/30	14/45b	31%
		3%	
acide N-acétyl-neuraminique			
	+MEM	+IFN	
	0/15	8/15c	53%
		0%	

Glucuronate de Na (référence négative)			
	+MEM	+IFN	
	6/45	5/45	11%
		13%	
Groupe témoin			
	+MEM	+IFN	
	0/120	6/120	5%
		0%	
ap 0,001 ; bp 0,01 ; cp 0,02 (comparé à IFN)			

tableau 3

L'examen de ces résultats montre que l'utilisation des sucres inhibiteurs de SCL permet de diminuer l'effet antagoniste des sarcolectines naturelles dont le taux augmente en raison de la stimulation  
5 immunitaire due au virus, entraînant une synthèse accrue des macrophages avec des lymphocytes T.

Dans les souris traitées seulement avec l'interféron, six animaux seulement sur 120 survivent, alors que l'augmentation de la survie totale est très  
10 nette lorsqu'on associe à l'interféron le N.A.N.A., la glucosamine ou le galacturonate.

En fournissant des SCL constituant des modèles pour des études in vitro, l'invention permet de sélectionner ceux des sucres présentant l'effet  
15 inhibiteur recherché et d'élaborer des médicaments les renfermant en tant qu'ingrédients actifs selon les quantités appropriées en vue d'un traitement antiviral de grande efficacité.

#### 20 Action antitumorale des sucres inhibiteurs de la SCL

La capacité des sucres inhibiteurs d'entraver l'effet stimulant de la croissance induite par la sarcolectine peut retentir indirectement sur le  
25 développement tumoral in vivo. Comme démontré in vitro selon l'invention, les SCL peuvent agir en synergie avec les facteurs de croissance et promouvoir la multiplication cellulaire indirectement. Les SCL naturelles pourraient donc favoriser l'oncogenèse en  
30 bloquant l'effet de l'interféron.

On mesurera donc l'intérêt d'inhiber l'action des SCL naturelles pour favoriser l'équilibre du développement tissulaire en faveur des inhibiteurs de la croissance.

Pour tester le pouvoir antitumoral des sucres inhibiteurs de SCL, on a greffé des cellules tumorales TG-180, provenant d'une tumeur résistante aux inhibiteurs métaboliques chimiques. A la concentration de  $3 \times 10^6$  cellules injectées par la voie IP à des souris Swiss de 20 gr, on obtient une tumeur ascitique qui est détectable en 10 jours et tue pratiquement 100% des animaux en 21-25 jours.

Dans des séries parallèles, les différents groupes d'animaux ont été traités 3 jours après l'inoculation, soit avec un sucre spécifique (glucosamine, lactose, galacturonate, N.A.N.A, neuramine-lactose), en solution de 5 à 10 %, la concentration en sucre étant de 100 mM, soit par le même traitement auquel on a associé une injection d'immuno-stimulant (extrait de *Corynebacterium parvum*, Mérieux, France) à la dose de 200µg/souris, ou d'interféron, ou les deux.

4 groupes de souris ont été utilisés par expérience.

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 4. Ils sont estimés par le pourcentage de tumeurs apparues le 10ème jour, par le temps moyen de survie des animaux (MST) en jours, et la survie finale (en pourcentage).

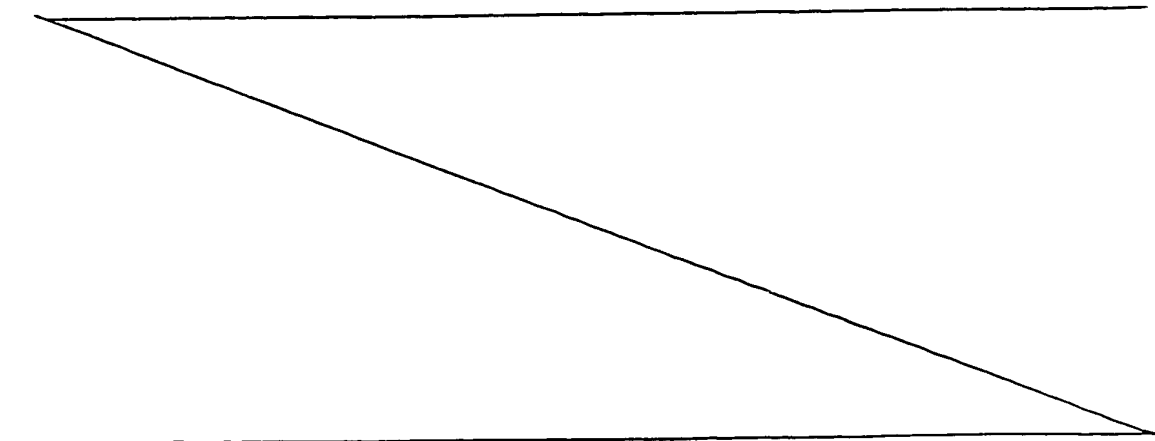


TABLEAU 4

Sucre	Nombre de souris	Tumeurs au 10e jour Nombre (%)	MST	SURVIE FINALE Nombre: (%)
<u>Medium</u>	105	94 (89)	19 ± 1	0 (0)
+ IFN	105	65 (68)	25 ± 4	7 (7)
+ CP	105	85 (89)	32 ± 5	10 (10)
+ CP+IFN	105	43 (41)	60 ± 7	45 (42)
<u>Glucosamine</u>	15	3 (20)	28 ± 6	1 (6)
+ IFN	45	6 (13)	39 ± 9	8 (17)
+ CP	75	26 (34)	67 ± 8	40 (53)
+ CP+IFN	60	17 (28)	70 ± 9	35 (58)
<u>Lactose</u>	30	11 (36)	26 ± 6	1 (3)
+ IFN	45	9 (20)	64 ± 9	6 (13)
+ CP	30	3 (10)	62 ± 13	14 (46)
+ CP+IFN	45	6 (13)	75 ± 10	29 (64)
<u>Galacturonate</u>	15	3 (20)	31 ± 10	1 (6)
+ IFN	15	6 (40)	34 ± 15	2 (13)
+ CP	15	2 (13)	42 ± 16	3 (20)
+ CP+IFN	15	1 (6)	81 ± 17	11 (73)
<u>NANA</u>	25	9 (34)	24 ± 6	0 (0)
+ IFN	30	5 (16)	39 ± 12	4 (13)
+ CP	15	6 (40)	69 ± 12	8 (53)
+ CP+IFN	30	13 (43)	70 ± 12	11 (36)
*D'autres sucres tels que le N-acetyl-glucosamine, le glucuronaté ont des effets anti-tumoraux comparables.				

Au dixième jour après la greffe, le traitement par tous les sucres testés, soit isolément, soit en association avec *Corynebacterium parvum* (CP) ou IFN, diminue considérablement l'incidence des tumeurs. La survie moyenne est particulièrement augmentée par la glucosamine et le galacturonate. En cas d'immunostimulation unique par le CP, la survie totale est considérablement augmentée par la glucosamine (53%) et le lactose (43%). L'association avec l'IFN augmente la survie moyenne surtout pour le lactose.

## II- Etude des effets inhibiteurs des amino-acides butyriques vis-à-vis des SCL

### Effets antitumoraux indirects des amino-acides butyriques

On met en oeuvre la même procédure expérimentale que pour le tableau précédent, mais en utilisant des sels butyriques : gamma amino-butyrique (GABA), alpha amino-butyrique, alpha-amino-isobutyrique, et du milieu témoin.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 5

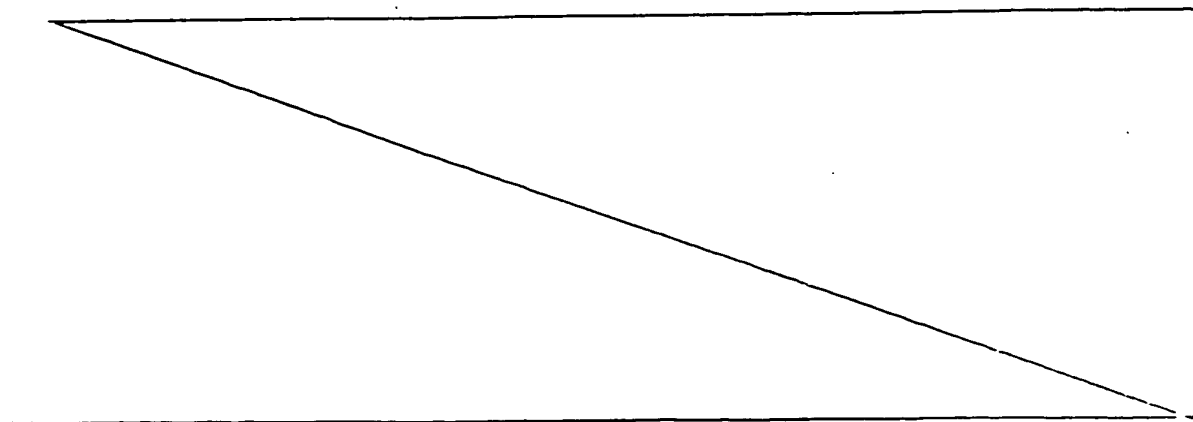


TABLEAU 5

Acide aminé	Nombre de souris	Tumeurs au 10e jour Nombre (%)	MST jours	Nombre	Survie Finale (%)
GABA	30	14 (46)	$35 \pm 9$	4	(13)
+ IFN	45	19 (42)	$43 \pm 10$	11	(24)
+ CP	45	25 (55)	$68 \pm 11$	24	(53)
+ CP+IFN	30	7 (23)	$70 \pm 13$	17	(56)
alpha amino but.	30	19 (63)	$26 \pm 1$	0	(0)
+ IFN	30	9 (30)	$25 \pm 2$	0	(0)
+ CP	30	18 (60)	$55 \pm 14$	7	(23)
CP+IFN	30	7 (23)	$62 \pm 14$	14	(47)
alpha amino-isc.	30	6 (20)	$31 \pm 7$	2	(7)
+ IFN	30	15 (50)	$31 \pm 10$	4	(13)
+ CP	30	14 (46)	$66 \pm 13$	13	(43)
CP+IFN	30	12 (40)	$64 \pm 13$	14	(47)
Milieu	105	94 (89)	$19 \pm 1$	0	(0)
+ IFN	105	65 (68)	$25 \pm 4$	7	(7)
+ CP	105	85 (89)	$32 \pm 5$	10	(10)
+ CP+IFN	105	43 (41)	$60 \pm 7$	45	(42)



Dans les mêmes conditions que les sucres inhibiteurs de la sarcolectine dans la série précédente, l'acide gamma amino-butyrique et l'alpha amino-isobutyrique inhibent de façon significative la tumorigénèse. L'apparition des tumeurs est retardée, l'augmentation de la survie moyenne est obtenue dans tous les groupes. Une injection unique de CP permet en outre une augmentation significative de la survie finale des animaux encore amplifiée avec l'association de l'interféron.

Comme dans le cas des sucres inhibiteurs, les SCL de l'invention constituent des modèles particulièrement précieux pour l'étude des effets anti-tumoraux des amino-acides butyriques et la mise au point d'un protocole de traitement (tableau 5).

### III- Effets directs de la sarcolectine sur la stimulation de la synthèse de l'ADN cellulaire

On a vérifié l'effet de la sarcolectine sur la synthèse de l'ADN de différentes cellules immuno-compétentes : H9 T lymphocytes et Daudi B lymphocytes, U937 monocytes, et étudié en parallèle, des lymphocytes T et B normaux d'origine splénique, des cellules L929 murines et des cellules HeLa humaines.

Dans tous les cas, le milieu de croissance ne contenait pas de sérum, seulement de la sarcolectine hautement purifiée telle qu'obtenue selon l'exemple 1.

Au bout de 24 heures, la synthèse de l'ADN des différentes populations cellulaires a été analysée en comparant les cellules témoins traitées par le même milieu et sans sarcolectine.

On constate une augmentation significative de la synthèse de l'ADN, en particulier pour les cellules H9, Daudi et U937, un peu moindre pour les lymphocytes T et B normaux et les cellules HeLa, alors qu'elle est restée au même niveau élevé que les lignées non ancrées pour les cellules de souris. Ces résultats montrent clairement que la sarcolectine a un effet stimulant propre sur la croissance, qui est indépendant des facteurs de croissance plus spécifiques auxquels elle doit s'ajouter.

Dans les biopsies prélevées au cours des exérèses de sarcomes ostéogéniques chez l'enfant, le fragment excrète dans un milieu sans sérum des quantités considérables de SCL identifiée par des tests de Western blot en utilisant de l'antisérum anti-55 kD.

Cette même lectine se retrouve également dans l'ascite prélevée au cours des greffes de sarcomes TG 180 de la souris (piste 4, sur la figure 5), les pistes 1 à 3 correspondant à des malades non cancéreux, et les pistes 5 à 8 à des sérums de sarcomes ostéogéniques humains.

IV- Effet inhibiteur de la sarcolectine sur la synthèse des protéines effectrices secondaires de l'interféron

L'effet antagoniste de la sarcolectine sur l'action de l'interféron peut être estimée en traitant les cellules par l'interféron pendant 5 à 6 heures, puis en enlevant le milieu et en le remplaçant par la sarcolectine pendant 18 heures. L'effet antagoniste de la SCL apparaît à partir de la 5ème heure et peut aboutir à la restauration de la cellule à l'état initial avant le traitement par l'interféron. La sarcolectine peut aussi inhiber l'action des IFN induits, soit par la poly(I)(C),

soit par le virus de Newcastle. Ces données suggèrent que, sans affecter sa production, l'action de l'interféron (induit par le poly(I)(C)), peut être inhibée par la SCL, ce qui aboutit à la diminution ou la

5 disparition totale de la rétroinhibition.

Dans ces conditions, l'effet propre du poly(I)(C) sur la croissance apparaît clairement. L'IFN et la SCL sont en équilibre et agissent également sur le poly(I)(C) en modifiant son expression, l'ensemble

10 aboutissant à un équilibre triangulaire.

V- Utilisation de la sarcolectine pour le diagnostic

Comme la sarcolectine stimule la synthèse de l'ADN et inhibe les protéines secondaires effectrices de l'interféron, sa présence peut être recherchée aussi bien

15 dans les tumeurs que dans différentes sécrétions biologiques, sérum, liquides d'ascites, placenta, etc.

Le diagnostic nécessite une méthode rapide de purification.

20 Le taux de sarcolectine dans le sérum humain ou animal peut être obtenu par exemple de la façon suivante:

- dilution du sérum au 1/10;
- abaissement du pH du milieu à pH 5 pendant 30 min à la température du laboratoire;

25 - ré-ajustement à pH 7,4 ; on note alors une précipitation importante qui doit être éliminée par centrifugation à 10 000 tours/min. pendant 30 min. ;

- ré-ajustement du pH du surnageant obtenu à pH 7,4.

30 La préparation purifiée ne contient qu'une bande de 65 kD. Toutefois, à forte concentration, une bande à 55 kD peut être détectée, en utilisant le Western

blot à l'aide d'anticorps monoclonaux ou mono-spécifiques anti-sarcolectine.

5 VI- Recherche de sarcolectine par agglutination des cellules

A titre d'exemple, on peut utiliser des cellules H9 provenant de lymphomes T humains, traitées par le formol à 10%. Les cellules peuvent être maintenues dans un tampon phosphate sans précaution particulière. Le titre de la sarcolectine peut être estimé par une gamme de dilutions géométriques, en général à base de 2, dans une microplaque à laquelle on ajoute une suspension de cellules fixées. L'agglutination se produit à 4°C et la limite est estimée par la dilution à laquelle environ 50% des cellules sont agglutinées.

VII- Analyse de la sarcolectine par l'augmentation de la synthèse d'ADN cellulaire

20 La suspension de cellules à tester doit être incubée avec la quantité de thymidine tritiée arbitrairement choisie. Il est important que le milieu ne contienne pas de sérum pendant la période d'essai, qui est en général de 24 heures.

25

VIII - Utilisation des SCL en thérapie anti-tumorale

30 Cette application est basée sur l'analyse du développement de tissus dont la croissance est normale et rapide comme le fœtus. Le sang placentaire contient d'une part des facteurs de croissance et les SCL, qui stimulent la synthèse du DNA, et d'autre part des

interférons qui, au contraire, l'inhibent en favorisant la différenciation cellulaire.

Ces trois types de facteurs apparaissent en alternance, ce qui entraîne une croissance discontinue.

5 D'après Lampl et al. (11) les poussées de croissance sont courtes et brutales de 24 heures, suivies de période d'arrêt de 30 à 60 jours.

Sur ces bases le traitement proposé est le suivant :

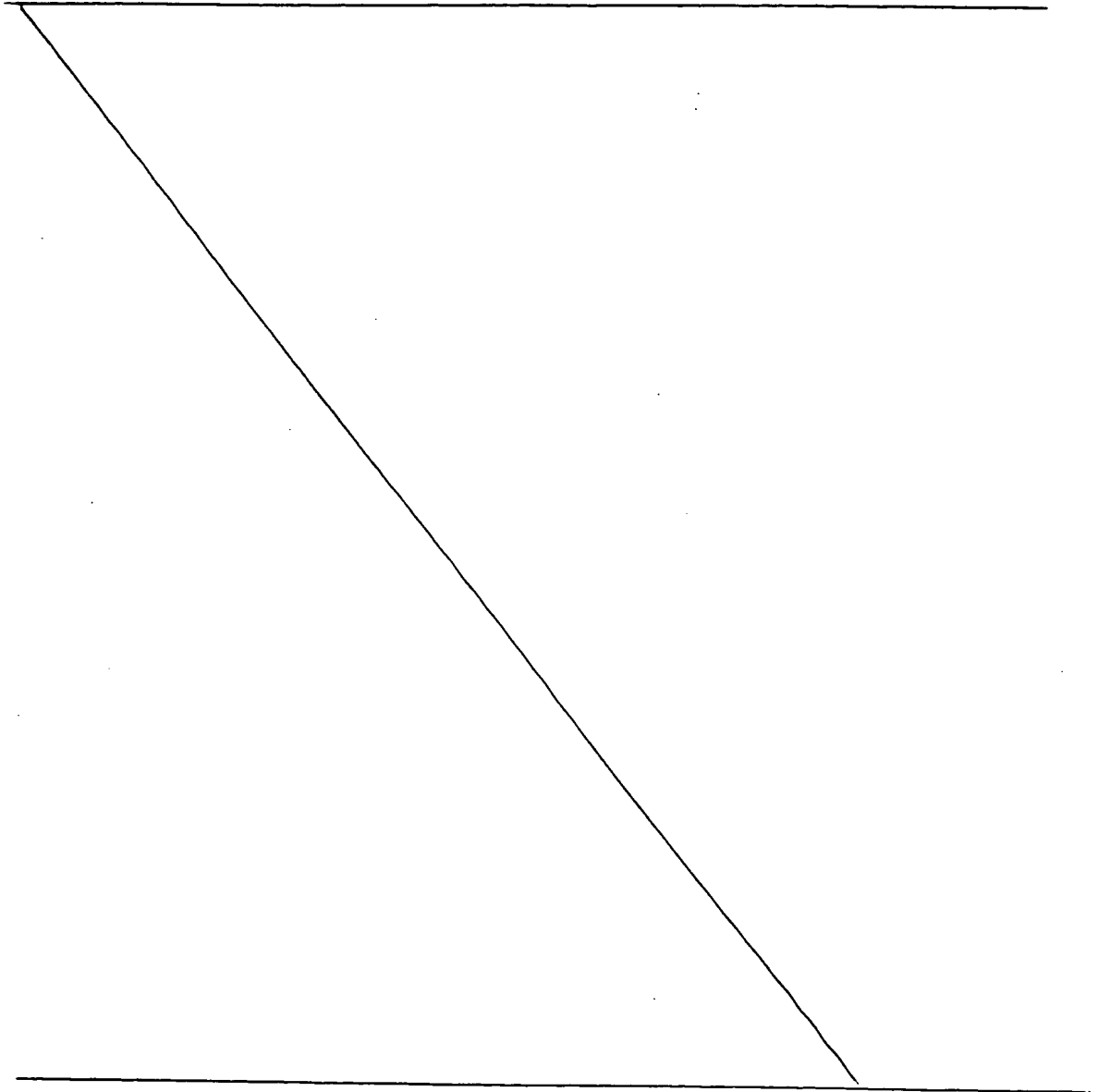
10 1. Stimulation unique de la croissance par la SCL employée par la voie parentale à des doses suffisantes pour augmenter d'une façon significative la prolifération des leucocytes dans le sang. Cette fonction peut être amplifiée par des sels d'aspartate (24 mM/kg.)  
15 administrés en parallèle pendant les 3 premiers jours. Elle peut être remplacée par la cimétidine.

On peut également associer l'interleukine 2 recombinante dans des conditions comparables.

2. Après un arrêt de 4-5 jours, le traitement  
20 de cibles comporte des IFN, surtout du groupe  $\alpha$  ou  $\beta$  injectés toutes les 48 h par la voie parentale (à des doses en général de  $3-5 \times 10^6$  unités par injection) pendant un mois. Ce traitement assure aux cellules générées en phase 1, une meilleure différenciation.  
25 L'effet des IFN peut être considérablement augmenté par les amino-acides butyriques (5g/kg) testés ci-dessus.

3. L'effet des interférons peut être amplifié par l'association des sucres précédemment cités, en particulier des lactoses ( $\alpha$  ou  $\beta$ ), le D galactose,  
30 l'acide N-acétyl neuraminique (N.A.N.A.) choisis comme exemple. Leur nature peut varier en fonction des espèces ou des tissus. Par exemple dans les sarcomes

ostéogéniques de l'enfant, le traitement local basé sur ces notions, pourrait utilement compléter le traitement chirurgical, en associant SCL -aspartate, suivi par IFN,  $\alpha$  lactose, N.A.N.A.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1/ Fournier F., et al, (1969), Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132, 943
- 5        2/ Chany C., et al, (1971), Nature, Biol. 230, 11
- 3/ Fournier F. et al (1972) Nature New Biol., 274, 1757.
- 4/ Chany, C. et al, (1969), C.R. Acad. Sci. Paris 269, 1236
- 10       5/ Duc-Goiran P. et al. (1985), Proc. Nat. Acad. Sci USA, 82, 5010
- 6/ Chany C. et al (1969), 269, 2628
- 7/ Jiang P.H. et al (1988) Biol., Chemistry, 15    263, 19154
- 8/ Chany-Fournier F. et al (1990). I of Cellular Physiology, 145, 173
- 9/ Glass C. et al, (1985) J. Cell Biol. 101, 236
- 20       10/ Sambrook J. et al, (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 11/ Lampl M et al (1992) Science 258 ; 801

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: A.D.B.E.A  
ASSOCIATION POUR LE DEVELOPPEMENT DE LA  
BIOTHERAPIE EXPERIMENTALE ET APPLIQUEE  
HOPITAL SAINT VINCENT DE PAUL
- (B) RUE: 74-82 AVENUE DENFERT ROCHEREAU
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75674

(ii) TITRE DE L' INVENTION: PROTEINES DE TYPE LECTINE ET LEURS  
APPLICATIONS BIOLOGIQUES

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 4

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1831 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMMENT: 62..1469

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GAATTCCGGC GAGTGC GCGC TCCTCCTCGC CCGCCGCTAG GTCCATCCCG GCCCAGCCAC	60
C ATG TCC ATC CAC TTC AGC TCC CCG GTA TTC ACC TCG CGC TCA GCC	106
Met Ser Ile His Phe Ser Ser Pro Val Phe Thr Ser Arg Ser Ala	
1 5 10 15	
GCC TTC TCG GGC CGC GGC GCC CAG GTG CGC CTG AGC TCC GCT CGC CCC	154
Ala Phe Ser Gly Arg Gly Ala Gln Val Arg Leu Ser Ser Ala Arg Pro	
20 25 30	



GGC GGC CTT GGC AGC AGC AGC CTC TAC GGC CTC GGC GCC TCG CGG CCG	202
Gly Gly Leu Gly Ser Ser Ser Leu Tyr Gly Leu Gly Ala Ser Arg Pro	
35 40 45	
CGC GTG GCC GTG CGC TCT GCC TAT GGG GGC CCG GTG GGC GCC GGC ATC	250
Arg Val Ala Val Arg Ser Ala Tyr Gly Gly Pro Val Gly Ala Gly Ile	
50 55 60	
CGC GAG GTC ACC ATT AAC CAG AGC CTG CTG GCC CCG CTG CGG CTG GGC	298
Arg Glu Val Thr Ile Asn Gln Ser Leu Leu Ala Pro Leu Arg Leu Gly	
65 70 75	
GCC GAC CCC TTC TCC CAG CGG GTG CGC CAG GAG GAG AGC GAG CAG ATC	346
Ala Asp Pro Phe Ser Gln Arg Val Arg Gln Glu Glu Ser Glu Gln Ile	
80 85 90 95	
AAG ACC CTC AAC AAC AAG TTT GCC TCC TTC ATC GAC AAG GTG CGG TTT	394
Lys Thr Leu Asn Asn Lys Phe Ala Ser Phe Ile Asp Lys Val Arg Phe	
100 105 110	
CTG GAG CAG CAG AAC AAG CTG CTG GAG ACC AAG TGG ACG CTG CTG CAG	442
Leu Glu Gln Gln Asn Lys Leu Leu Glu Thr Lys Trp Thr Leu Leu Gln	
115 120 125	
GAG CAG AAG TCG GCC AAG AGC AGC CGC CTC CCA GAC ATC TTT GAG GCC	490
Glu Gln Lys Ser Ala Lys Ser Ser Arg Leu Pro Asp Ile Phe Glu Ala	
130 135 140	
CAG ATT GCT GGC CTT CGG GGT CAG CTT GAG GCA ATG CAG GTG GAT GGG	538
Gln Ile Ala Gly Leu Arg Gly Gln Leu Glu Ala Met Gln Val Asp Gly	
145 150 155	
GGC CGC CTG GAG CAG GGG CTG CGG ACG ATG CAG GAT GTG GTG GAG GAC	586
Gly Arg Leu Glu Gln Gly Leu Arg Thr Met Gln Asp Val Val Glu Asp	
160 165 170 175	
TTC AAG AAT AAG TAC GAA GAT GAA ATT AAC CGC CGC ACA GCT GCT GAG	634
Phe Lys Asn Lys Tyr Glu Asp Glu Ile Asn Arg Arg Thr Ala Ala Glu	
180 185 190	
AAT GAG TTT GTG GTC CTG AAG AAG GAT GTG GAT GCT GCC TAC ATG AGC	682
Asn Glu Phe Val Val Leu Lys Lys Asp Val Asp Ala Ala Tyr Met Ser	
195 200 205	
AAG GTG GAG CTG GAG GCC AAG GTG GAT GCC CTG AAT GAT GAG ATC AAC	730
Lys Val Glu Leu Glu Ala Lys Val Asp Ala Leu Asn Asp Glu Ile Asn	
210 215 220	
TTC CTC AGG ACC CTC AAT GAG ACG GAG TTG ACA GAG CTT CAG TCC CAG	778
Phe Leu Arg Thr Leu Asn Glu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Gln Ser Gln	
225 230 235	
ATC TCC GAC ACA TCT GTG GTG CTG TCC ATG GAC AAC AGT CGC TCC CTG	826
Ile Ser Asp Thr Ser Val Val Leu Ser Met Asp Asn Ser Arg Ser Leu	
240 245 250 255	
GAC CTG GAC GGC ATC ATC GCT GAG GTC AAG GCG CAG TAT GAG GAG ATG	874



ATGGCACGGC AGCTGCGTGA GTACCAGGAA CTCATGAGCG TGAAGCTGGC CCTGGACATC	1676
GAGATCGCCA CCTACCGCAA GCTGCTGGAG GGCGAGGAGA GCCGGTTGGC TGGAGATGGA	1736
GTGGGAGCCG TGAATATCTC TGTGATGAAT TCCACTGGTG GCAGTAGCAG TGGCGGTGGC	1796
ATTGGGCTAG CCCTCGGGGG AACCATGGGC AGCAA	1831

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 405 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMENT: 1..405

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

ATG TCC ATC CAC TTC AGC TCC CCG GTA TTC ACC TCG CGC TCA GCC GCC	48
Met Ser Ile His Phe Ser Ser Pro Val Phe Thr Ser Arg Ser Ala Ala	
1 5 10 15	
TTC TCG GGC CGC GGC GCC CAG GTG CGC CTG AGC TCC GCT CGC CCC GGC	96
Phe Ser Gly Arg Gly Ala Gln Val Arg Leu Ser Ser Ala Arg Pro Gly	
20 25 30	
GGC CTT GGC AGC AGC AGC CTC TAC GGC CTC GGC GCC TCG CGG CCG CGC	144
Gly Leu Gly Ser Ser Ser Leu Tyr Gly Leu Gly Ala Ser Arg Pro Arg	
35 40 45	
GTG GCC GTG CGC TCT GCC TAT GGG GGC CCG GTG GGC GCC GGC ATC CGC	192
Val Ala Val Arg Ser Ala Tyr Gly Gly Pro Val Gly Ala Gly Ile Arg	
50 55 60	
GAG GTC ACC ATT AAC CAG AGC CTG CTG GCC CCG CTG CGG CTG GGC GCC	240
Glu Val Thr Ile Asn Gln Ser Leu Leu Ala Pro Leu Arg Leu Gly Ala	
65 70 75 80	
GAC CCC TTC TCC CAG CGG GTG CGC CAG GAG GAG AGC GAG CAG ATC AAG	288
Asp Pro Phe Ser Gln Arg Val Arg Gln Glu Glu Ser Glu Gln Ile Lys	
85 90 95	
ACC CTC AAC AAC AAG TTT GCC TCC TTC ATC GAC AAG GTG CGG TTT CTG	336
Thr Leu Asn Asn Lys Phe Ala Ser Phe Ile Asp Lys Val Arg Phe Leu	
100 105 110	
GAG CAG CAG AAC AAG CTG CTG GAG ACC AAG TGG ACG CTG CTG CAG GAG	384
Glu Gln Gln Asn Lys Leu Leu Glu Thr Lys Trp Thr Leu Leu Gln Glu	
115 120 125	

CAG AAG TCG GCC AAG AGC AGC  
 Gln Lys Ser Ala Lys Ser Ser  
 130 135

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 469 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Met	Ser	Ile	His	Phe	Ser	Ser	Pro	Val	Phe	Thr	Ser	Arg	Ser	Ala	Ala	1	5	10	15
Phe	Ser	Gly	Arg	Gly	Ala	Gln	Val	Arg	Leu	Ser	Ser	Ala	Arg	Pro	Gly	20	25	30	
Gly	Leu	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Tyr	Gly	Leu	Gly	Ala	Ser	Arg	Pro	Arg	35	40	45	
Val	Ala	Val	Arg	Ser	Ala	Tyr	Gly	Gly	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Ile	Arg	50	55	60	
Glu	Val	Thr	Ile	Asn	Gln	Ser	Leu	Leu	Ala	Pro	Leu	Arg	Leu	Gly	Ala	65	70	75	80
Asp	Pro	Phe	Ser	Gln	Arg	Val	Arg	Gln	Glu	Glu	Ser	Glu	Gln	Ile	Lys	85	90	95	
Thr	Leu	Asn	Asn	Lys	Phe	Ala	Ser	Phe	Ile	Asp	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	100	105	110	
Glu	Gln	Gln	Asn	Lys	Leu	Leu	Glu	Thr	Lys	Trp	Thr	Leu	Leu	Gln	Glu	115	120	125	
Gln	Lys	Ser	Ala	Lys	Ser	Ser	Arg	Leu	Pro	Asp	Ile	Phe	Glu	Ala	Gln	130	135	140	
Ile	Ala	Gly	Leu	Arg	Gly	Gln	Leu	Glu	Ala	Met	Gln	Val	Asp	Gly	Gly	145	150	155	160
Arg	Leu	Glu	Gln	Gly	Leu	Arg	Thr	Met	Gln	Asp	Val	Val	Glu	Asp	Phe	165	170	175	
Lys	Asn	Lys	Tyr	Glu	Asp	Glu	Ile	Asn	Arg	Arg	Thr	Ala	Ala	Glu	Asn	180	185	190	
Glu	Phe	Val	Val	Leu	Lys	Lys	Asp	Val	Asp	Ala	Ala	Tyr	Met	Ser	Lys	195	200	205	
Val	Glu	Leu	Glu	Ala	Lys	Val	Asp	Ala	Leu	Asn	Asp	Glu	Ile	Asn	Phe	210	215	220	
Leu	Arg	Thr	Leu	Asn	Glu	Thr	Glu	Leu	Thr	Glu	Leu	Gln	Ser	Gln	Ile				

225		230		235		240
Ser Asp Thr	Ser Val Val Leu Ser Met	Asp Asn Ser Arg Ser Leu Asp				
	245	250			255	
Leu Asp Gly Ile Ile Ala Glu Val Lys Ala Gln Tyr Glu Glu Met Ala		265			270	
	260					
Lys Cys Ser Arg Ala Glu Ala Glu Ala Trp Tyr Gln Thr Lys Phe Glu		280			285	
	275					
Thr Leu Gln Ala Gln Ala Gly Lys His Gly Asp Asp Leu Arg Asn Thr		295			300	
	290					
Arg Asn Glu Ile Ser Glu Met Asn Arg Ala Ile Gln Arg Leu Gln Ala		310			315	320
Glu Ile Asp Asn Ile Lys Asn Gln Arg Ala Lys Leu Glu Ala Ala Ile		325			330	335
Ala Glu Ala Glu Glu Arg Gly Glu Leu Ala Leu Lys Asp Ala Arg Ala		340			345	350
Lys Gln Glu Glu Leu Glu Ala Ala Leu Gln Arg Ala Lys Gln Asp Met		355			360	365
Ala Arg Gln Leu Arg Glu Tyr Gln Glu Leu Met Ser Val Lys Leu Ala		370			375	380
Leu Asp Ile Glu Ile Ala Thr Tyr Arg Lys Leu Leu Glu Gly Glu Glu		385			390	395
						400
Ser Arg Leu Ala Gly Asp Gly Val Gly Ala Ala Asn Ile Ser Val Met		405			410	415
Asn Ser Thr Gly Gly Ser Ser Ser Gly Gly Gly Ile Gly Leu Thr Leu		420			425	430
Gly Gly Thr Met Gly Ser Asn Ala Leu Ser Phe Ser Ser Ser Ala Gly		435			440	445
Pro Gly Leu Leu Lys Ala Tyr Ser Ile Arg Thr Ala Ser Ala Ser Arg		450			455	460
Arg Ser Thr Arg Asp						
465						

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 135 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:



## REVENDICATIONS

1/ Séquences de nucléotides, caractérisées en ce qu'elles sont isolées de leur environnement naturel et qu'elles comprennent au moins une partie de la séquence SEQ ID N°1, un ou plusieurs nucléotides étant le cas échéant modifiés, étant entendu que ces séquences sont capables de coder pour des polypeptides possédant des propriétés lectiniques.

2/ Séquences de nucléotides, caractérisées en ce qu'elles sont isolées de leur environnement naturel et qu'elles sont capables de coder, mises en oeuvre selon les techniques classiques de l'ADN recombinant, pour des sarcolectines comprenant au moins un enchaînement d'acides aminés tel qu'indiqué sur SEQ ID N°1, dans lequel un ou plusieurs acides aminés sont le cas échéant, modifiés.

3/ Séquences de nucléotides, caractérisées en ce qu'elles sont isolées de leur environnement naturel et qu'elles sont capables de s'hybrider avec au moins un fragment de SEQ ID N°1 portant au moins une partie de l'information génétique pour une sarcolectine.

4/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle correspond au cadre ouvert de lecture de 1407 pb allant de la position 62, dans SEQ ID N°1, à la position 1469.

5/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie de la région 5' de SEQ ID N°1 et/ou de la région 3'.

6/ Séquences de nucléotides selon la revendication 5, caractérisées en ce qu'elles comprennent

au moins une partie de la séquence SEQ ID N°2, un ou plusieurs nucléotides étant le cas échéant modifiés.

7/ Les séquences d'ARN-m correspondant aux séquences selon l'une des revendications 1 à 6.

5 8/ Les séquences anti-sens correspondant aux séquences selon l'une des revendications précédentes.

9/ Les ADNc correspondant aux séquences selon l'une des revendications 1 à 8.

10 10/ Vecteurs d'expression contenant au moins l'une des séquences de nucléotides selon l'une des revendications précédentes, soumises au contrôle d'un promoteur approprié.

15 11/ Cellules hôtes transfectées par les vecteurs selon la revendication 10, comprenant les protéines recombinantes exprimées.

20 12/ Nouveaux composés, caractérisés en ce qu'ils possèdent une activité lectinique et comprennent au moins une partie d'un enchaînement d'acides aminés dans la séquence codée par l'une des séquences de nucléotides définies dans l'une des revendications 1 à 6, un ou plusieurs acides aminés étant le cas échéant modifiés, dès lors que cette modification n'altère pas les propriétés lectiniques des sarcolectines.

25 13/ Nouveaux composés, caractérisés en ce qu'ils présentent un enchaînement d'acides aminés dans SEQ ID N°3 ou SEQ ID N°4.

30 14/ Nouveaux composés, caractérisés en ce qu'ils correspondent à la séquence codée par le cadre ouvert de lecture de SEQ ID N°1 et comprennent 469 acides aminés, leur poids moléculaire étant évalué à 55 kD environ.

15/ Nouveaux composés, caractérisés en ce qu'ils sont tels qu'obtenus par expression, dans une cellule hôte appropriée, selon les techniques de l'ADN



recombinant, d'un vecteur d'expression contenant une séquence d'ADN telle que définie dans l'une des revendications 1 à 6, récupération du composé exprimé et purification.

5                   16/ Nouveaux composés, caractérisés en ce qu'il s'agit de fragments ou dérivés des composés selon l'une des revendications 12 à 15, dès lors qu'ils conservent au moins en partie des propriétés lectiniques.

10                   17/ Composés, tels qu'obtenus par purification à partir d'extraits tissulaires, par un procédé comprenant:

15                   - le traitement de l'extrait tissulaire contenant des lectines, dans des conditions ménagées par de la pepsine ou à pH acide, dans des conditions permettant d'éliminer au moins la majeure partie des protéines contaminantes tout en conservant l'activité lectinique,

20                   - de chromatographies sur Séphacryl-S-200 et, le cas échéant, DEAE cellulose

25                   - une chromatographie sur CM-Trisacryl-M  
                    - une chromatographie d'affinité en utilisant comme ligand un sucre tel que l'acide N-acétyl neuraminique, et

                    - une séparation en HPLC inverse,  
25                   18/ Composés, selon la revendication 17, caractérisés en ce que la fraction séparée en HPLC inverse est soumise à une électrophorèse sur gel SDS-PAGE et dénaturation et qu'on récupère les bandes correspondant à 65kD, 55kD et  $\leq$  14kD.

30                   19/ Les anticorps dirigés contre les composés selon l'une des revendications 12 à 18.

20/ Anticorps selon la revendication 19, caractérisés en ce qu'il s'agit des anticorps dirigés contre la protéine de 65kD selon la revendication 18 et qu'ils reconnaissent les protéines de 65kD et de 55kD de la revendication 18, ainsi que l'albumine.

21/ Anticorps selon la revendication 19, caractérisés en ce qu'il s'agit d'anticorps dirigés contre la protéine de 55 kD selon la revendication 18 et qu'ils reconnaissent, outre la protéine 55 kD, également la protéine de 65 kD.

22/ Procédé d'obtention de sarcolectines à degré de pureté élevé comprenant le traitement d'un extrait tissulaire contenant de la sarcolectine par de la pepsine ou à pH acide de manière à éliminer au moins la majeure partie des protéines contaminantes de l'extrait tout en conservant l'activité biologique lectinique, et l'élimination d'impuretés par chromatographie sur Séphacryl-S -200 et DEAE cellulose, caractérisé en ce qu'il comporte en outre une étape de chromatographie sur CM-Trisacryl-M, puis de chromatographie d'affinité utilisant comme ligand l'acide N-acétyl-neuraminique, la pureté des SCL étant vérifiée par HPLC si on le souhaite.

23/ Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que l'étape de chromatographie sur CM-Trisacryl-M est réalisée à l'aide d'un premier tampon afin d'éliminer au moins la majorité de l'albumine contaminante, puis d'un deuxième tampon pour éluer les SCL retenues sur la colonne.

24/ Procédé selon la revendication 22 ou 23, caractérisé en ce que l'étape de chromatographie d'affinité réalisée avec un sucre comme ligand comprend l'utilisation d'une colonne de gel d'agarose sur lequel est fixé le sucre et d'au moins deux tampons, de manière

à éluer tout d'abord les SCL, puis à éliminer les protéines contaminantes.

25/ Procédé selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisé en ce que la séparation en HPLC est réalisée à l'aide d'un système eau/acétonitrile/acide trifluoroacétique.

26/ Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce que la fraction correspondant au pic principal dans l'étape de HPLC est soumise à une électrophorèse sur gel SDS-PAGE et dénaturation et qu'on récupère les bandes de 65kD, 55 kD et  $\leq$  14 kD respectivement.

27/ Procédé d'obtention de sarcolectines à degré de pureté élevé, caractérisé en ce qu'il comprend:

- l'abaissement du pH du milieu à pH 5 pendant 30 minutes ;

- l'abaissement à pH 5 ce qui conduit à un précipité important, qui sera éliminé par centrifugation;

- le réajustement à pH 7,4 et la récupération du surnageant qui contient les protéines 65 et 55 kD reconnaissables par les Western blots à l'aide d'anticorps spécifiques.

28/ Utilisation des SCL selon l'une des revendications 12 à 18 comme co-facteurs de croissance, plus spécialement pour contribuer à la régénérescence des tissus lésés et à l'amélioration de processus de cicatrisation.

29/ Utilisation des SCL selon l'une des revendications 12 à 18, comme agents thérapeutiques de stimulation du système immunitaire, en particulier comme stimulant de l'immunité spécifique, le cas échéant en

association avec des facteurs de croissance spécifiques, comme l'interleukine 2.

30/ Utilisation des SCL selon l'une des revendications 12 à 18, pour sélectionner des inhibiteurs de leur activité lectinique, tels que les sucres ou les acides aminés butyriques, et éventuellement les interférons à haute dose.

31/ Utilisation des anticorps selon l'une des revendications 19 à 21, pour bloquer l'action des SCL produites en excès dans des états pathologiques, comme les cancers, les maladies virales chroniques ou auto-immunes.

32/ Méthode in vitro de dosage biologique de SCL, caractérisée en ce qu'elle comprend

- la mise en contact d'un échantillon biologique à analyser ou de cellules avec une préparation d'anticorps anti-SCL selon la revendication 21, ou d'un fragment d'anticorps, immobilisé sur un support solide, dans des conditions appropriées pour la production d'un complexe antigène-anticorps, avec les SCL lorsqu'elles sont présentes dans l'échantillon ou les cellules,

- la mise en évidence de la formation d'un tel complexe de type antigène-anticorps.

33/ Kit pour le diagnostic de la présence de SCL dans un échantillon biologique ou des cellules, caractérisé en ce qu'il comprend

- une phase solide appropriée servant de support,

- une préparation d'anticorps anti-SCL selon la revendication 21 ou de fragments, libres ou immobilisés ,

- des solutions tampons et réactifs appropriés pour les réactions immunologiques et pour les réactions de détection.

34/ Méthode pour détecter in vitro des SCL, caractérisée en ce qu'elle comprend

- la mise en contact d'un échantillon biologique à analyser ou de cellules avec une sonde élaborée à partir d'un fragment de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 7 ou 9, dans des conditions appropriées pour la production d'un complexe d'hybridation avec les ADN codant pour des SCL lorsqu'ils sont présents dans l'échantillon ou les cellules, et

- la mise en évidence de la formation du complexe d'hydratation lorsque les SCL sont présentes dans l'échantillon ou les cellules.

35/ Kit pour détecter in-vitro la présence de gènes codant pour des SCL, caractérisé en ce qu'il comprend :

- des sondes de nucléotides élaborées à partir des séquences définies dans l'une des revendications 1 à 7 ou 9, et

- des solutions tampons et réactifs pour la réaction d'hybridation.

36/ Utilisation des séquences anti-sens selon la revendication 8, pour bloquer l'expression de SCL selon l'une des revendications 12 à 18.

37/ Utilisation d'un composé selon l'une des revendications 12 à 16 fixé à de l'albumine pour réaliser un véhicule retard.

L'invention vise en particulier leur utilisation dans des traitements à l'interféron en mettant à profit leur effet inhibiteur de la synthèse des protéines effectrices secondaires de manière à restituer  
5 à la cellule son état initial et la sensibilité normale à l'interféron.

Les SCL sont ainsi avantageusement mises en oeuvre dans des protocoles d'administrations répétées d'IFN, pour traiter des états pathologiques d'origine  
10 infectieuse, par exemple au cours des phases finales des infections du SIDA ou au cours des maladies auto-immunes, comme le lupus érythémateux.

Les SCL de l'invention peuvent être également utilisées comme adjuvants de vaccination, en raison de  
15 leur capacité à augmenter la prolifération des cellules immuno-compétentes.

Selon un autre aspect, l'invention vise l'utilisation des SCL de l'invention en tant qu'outils pour rechercher des composés inhibiteurs des  
20 sarcolectines naturelles.

En particulier, l'invention vise l'utilisation des SCL pour sélectionner des composés inhibiteurs de leur activité lectinique, tels que des sucres ou des  
amino-acides butyriques, et éventuellement les  
25 interférons à haute dose.

Les médicaments élaborés à partir de ces composés inhibiteurs, qui renferment des quantités efficaces de ces composés pour obtenir l'inhibition recherchée, en association avec des excipients

classiques. Ils sont également visés par l'invention en tant que produits nouveaux.

5 En thérapeutique, les anticorps anti-SCL de l'invention constituent des agents particulièrement précieux pour inhiber les effets des SCL produites en excès dans des états pathologiques comme les cancers, les maladies virales chroniques ou auto-immunes.

10 Les médicaments élaborés à partir de ces anticorps sont caractérisés en ce qu'ils contiennent une quantité efficace de ces anticorps pour les applications envisagées, en association avec un véhicule pharmaceutique inerte.

Ces médicaments sont spécialement appropriés pour les traitements anti-tumoraux.

15 Dans les différentes applications thérapeutiques évoquées ci-dessus, les SCL sont, le cas échéant, fixées à de l'albumine à des fins de stabilisation, pour réaliser un véhicule retard ou pour faciliter leur diffusion dans les tissus et l'expression  
20 de leurs fonctions.

En diagnostic, ces anticorps sont utilisables pour toutes les réactions immunologiques, en particulier les ELISA et Western Blots, et permettent de déterminer qualitativement et quantitativement la présence de SCL  
25 dans un extrait biologique prélevé chez un patient.

L'invention vise ainsi une méthode pour détecter in vitro les SCL, et tout spécialement la SCL de 55 kD telle que purifiée selon les méthodes décrites

recombinant, d'un vecteur d'expression contenant une séquence d'ADN telle que définie dans l'une des revendications 1 à 6, récupération du composé exprimé et purification.

5                   16/ Nouveaux composés, caractérisés en ce qu'il s'agit de fragments ou dérivés des composés selon l'une des revendications 12 à 15, dès lors qu'ils conservent au moins en partie des propriétés lectiniques.

10                   17/ Composés selon la revendication 12, tels qu'obtenus par purification à partir d'extraits tissulaires, par un procédé comprenant:

15                   - le traitement de l'extrait tissulaire contenant des lectines, dans des conditions ménagées par de la pepsine ou à pH acide, dans des conditions permettant d'éliminer au moins la majeure partie des protéines contaminantes tout en conservant l'activité lectinique,

                  - de chromatographies sur Séphacryl-S-200 et, le cas échéant, DEAE cellulose

20                   - une chromatographie sur CM-Trisacryl-M

                  - une chromatographie d'affinité en utilisant comme ligand un sucre tel que l'acide N-acétyl neuraminique, et

                  - une séparation en HPLC inverse,

25                   18/ Composés, selon la revendication 17, caractérisés en ce que la fraction séparée en HPLC inverse est soumise à une électrophorèse sur gel SDS-PAGE et dénaturation et qu'on récupère les bandes correspondant à 65kD, 55kD et  $\leq$  14kD.

30                   19/ Les anticorps dirigés contre les composés selon l'une des revendications 12 à 18.



20/ Anticorps selon la revendication 19, caractérisés en ce qu'il s'agit des anticorps dirigés contre la protéine de 65kD selon la revendication 18 et qu'ils reconnaissent les protéines de 65kD et de 55kD de la revendication 18, ainsi que l'albumine.

21/ Anticorps selon la revendication 19, caractérisés en ce qu'il s'agit d'anticorps dirigés contre la protéine de 55 kD selon la revendication 18 et qu'ils reconnaissent, outre la protéine 55 kD, également la protéine de 65 kD.

22/ Procédé d'obtention de composés selon la revendication 12 ou 17, à degré de pureté élevé comprenant le traitement d'un extrait tissulaire contenant de la sarcolectine par de la pepsine ou à pH acide de manière à éliminer au moins la majeure partie des protéines contaminantes de l'extrait tout en conservant l'activité biologique lectinique, et l'élimination d'impuretés par chromatographie sur Séphacryl-S -200 et DEAE cellulose, caractérisé en ce qu'il comporte en outre une étape de chromatographie sur CM-Trisacryl-M, puis de chromatographie d'affinité utilisant comme ligand l'acide N-acétyl-neuraminique, la pureté des SCL étant vérifiée par HPLC si on le souhaite.

23/ Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que l'étape de chromatographie sur CM-Trisacryl-M est réalisée à l'aide d'un premier tampon afin d'éliminer au moins la majorité de l'albumine contaminante, puis d'un deuxième tampon pour éluer les SCL retenues sur la colonne.

24/ Procédé selon la revendication 22 ou 23, caractérisé en ce que l'étape de chromatographie d'affinité réalisée avec un sucre comme ligand comprend l'utilisation d'une colonne de gel d'agarose sur lequel est fixé le sucre et d'au moins deux tampons, de manière

à éluer tout d'abord les SCL, puis à éliminer les protéines contaminantes.

5 25/ Procédé selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisé en ce que la séparation en HPLC est réalisée à l'aide d'un système eau/acétonitrile/acide trifluoroacétique.

10 26/ Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce que la fraction correspondant au pic principal dans l'étape de HPLC est soumise à une électrophorèse sur gel SDS-PAGE et dénaturation et qu'on récupère les bandes de 65kD, 55 kD et  $\leq$  14 kD respectivement.

15 27/ Procédé d'obtention de sarcolectines à degré de pureté élevé, caractérisé en ce qu'il comprend:

- l'abaissement du pH du milieu à pH 5 pendant 30 minutes ;

20 - l'abaissement à pH 5 ce qui conduit à un précipité important, qui sera éliminé par centrifugation;

- le réajustement à pH 7,4 et la récupération du surnageant qui contient les protéines 65 et 55 kD reconnaissables par les Western blots à l'aide d'anticorps spécifiques.

25 28/ Facteurs de croissance, utilisables plus spécialement pour contribuer à la régénérescence des tissus lésés et à l'amélioration de processus de cicatrisation, caractérisés en ce qu'il s'agit de SCL selon l'une des revendications 12 à 18.

30 29/ Agents thérapeutiques de stimulation du système immunitaire, en particulier de l'immunité spécifique, caractérisés en ce qu'il s'agit de SCL selon l'une des revendications 12 à 18, le cas échéant en

association avec des facteurs de croissance spécifiques, comme l'interleukine 2.

5                   30/ Utilisation des SCL selon l'une des revendications 12 à 18, pour sélectionner des inhibiteurs de leur activité lectinique, tels que les sucres ou les acides aminés butyriques, et éventuellement les interférons à haute dose.

10                   31/ Agents capables de bloquer l'action des SCL produites en excès dans des états pathologiques, comme les cancers, les maladies virales chroniques ou auto-immunes, caractérisés en ce qu'il s'agit des anticorps selon l'une des revendications 19 à 21.

~~32/ Méthode in vitro de dosage biologique de SCL, caractérisée en ce qu'elle comprend~~

15                   - la mise en contact d'un échantillon biologique à analyser ou de cellules avec une préparation d'anticorps anti-SCL selon la revendication 21, ou d'un fragment d'anticorps, immobilisé sur un support solide, dans des conditions appropriées pour la  
20                   production d'un complexe antigène-anticorps, avec les SCL lorsqu'elles sont présentes dans l'échantillon ou les cellules,

                    - la mise en évidence de la formation d'un tel complexe de type antigène-anticorps.

25                   33/ Kit pour le diagnostic de la présence de SCL dans un échantillon biologique ou des cellules, caractérisé en ce qu'il comprend

                    - une phase solide appropriée servant de support,

30                   - une préparation d'anticorps anti-SCL selon la revendication 21 ou de fragments, libres ou immobilisés ,

- des solutions tampons et réactifs appropriés pour les réactions immunologiques et pour les réactions de détection.

5 34/ Méthode pour détecter in vitro des SCL, caractérisée en ce qu'elle comprend

- la mise en contact d'un échantillon biologique à analyser ou de cellules avec une sonde élaborée à partir d'un fragment de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 7 ou 9, dans des conditions appropriées pour la production d'un complexe d'hybridation avec les ADN codant pour des SCL lorsqu'ils sont présents dans l'échantillon ou les cellules, et

10 - la mise en évidence de la formation du complexe d'hybridation lorsque les SCL sont présentes dans l'échantillon ou les cellules.

15 35/ Kit pour détecter in-vitro la présence de gènes codant pour des SCL, caractérisé en ce qu'il comprend :

20 - des sondes de nucléotides élaborées à partir des séquences définies dans l'une des revendications 1 à 7 ou 9, et

- des solutions tampons et réactifs pour la réaction d'hybridation.

25 36/ Utilisation des séquences anti-sens selon la revendication 8, pour bloquer l'expression de SCL selon l'une des revendications 12 à 18.

37/ Utilisation d'un composé selon l'une des revendications 12 à 16 fixé à de l'albumine pour réaliser un véhicule retard.

1/6

FIGURE 1

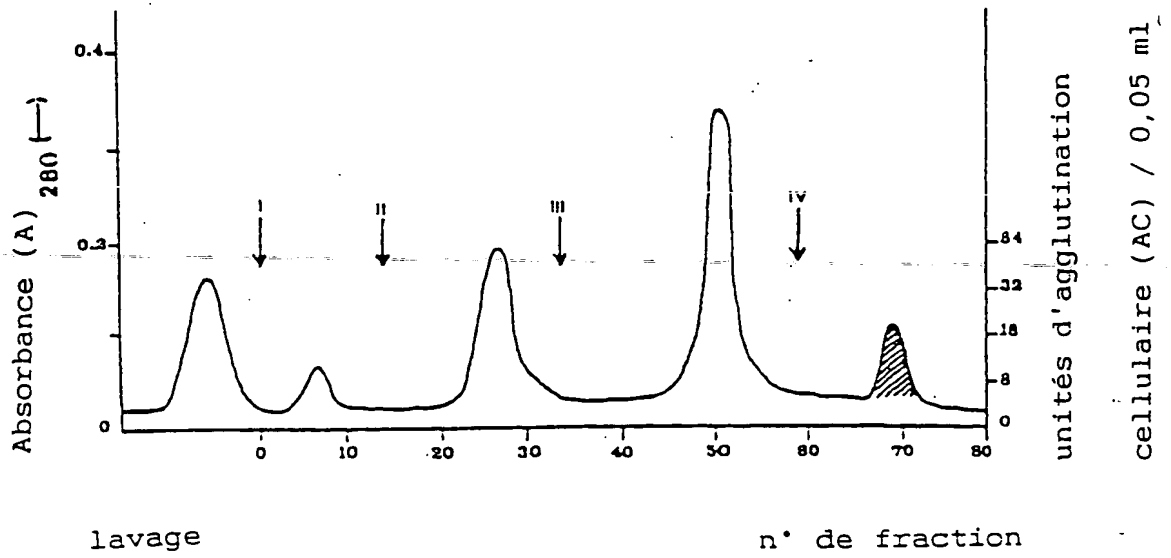


Figure 1A

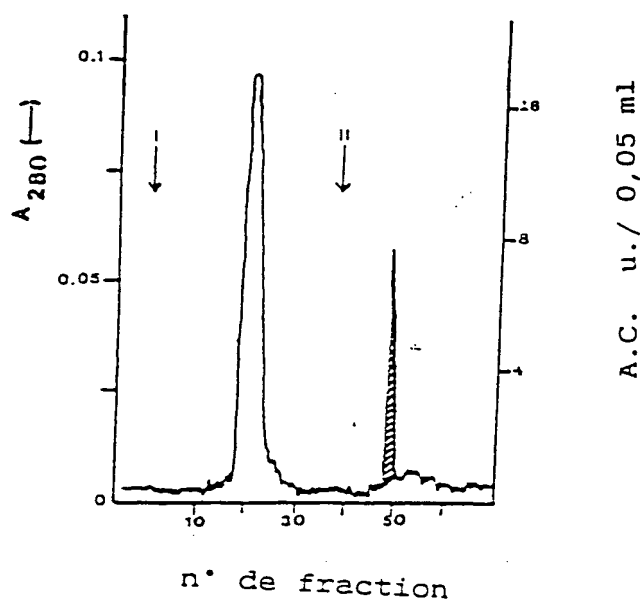
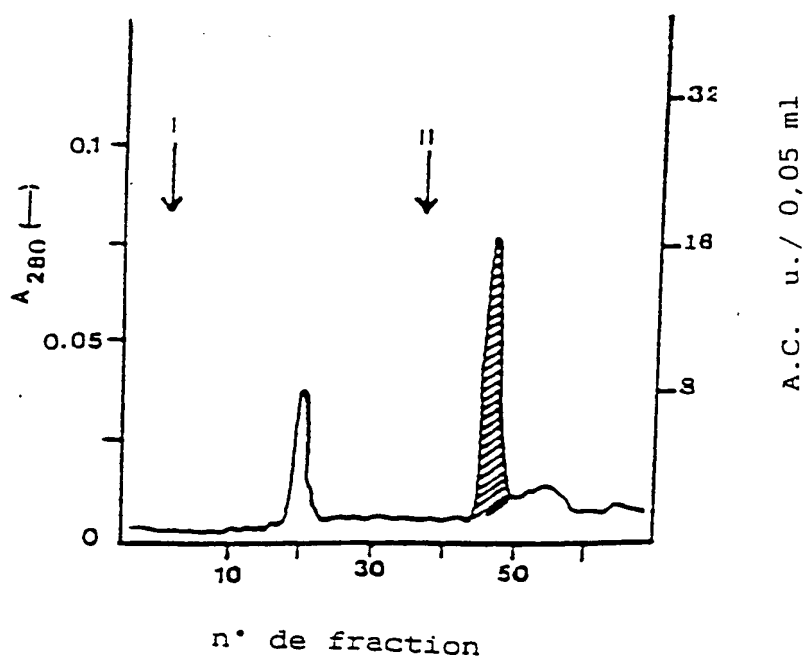


Figure 1B



3/6

Figure 2A

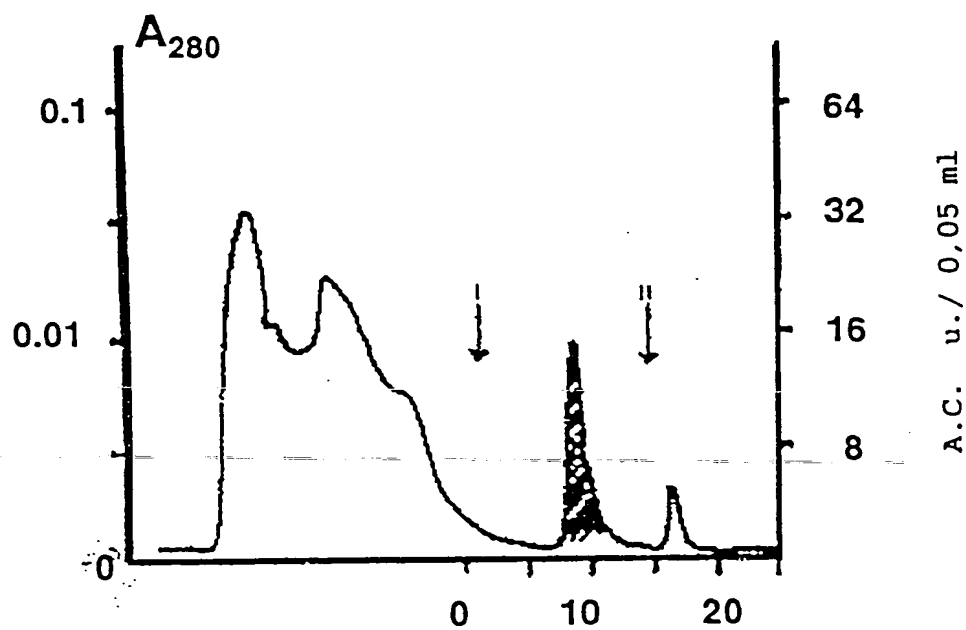


Figure 2B

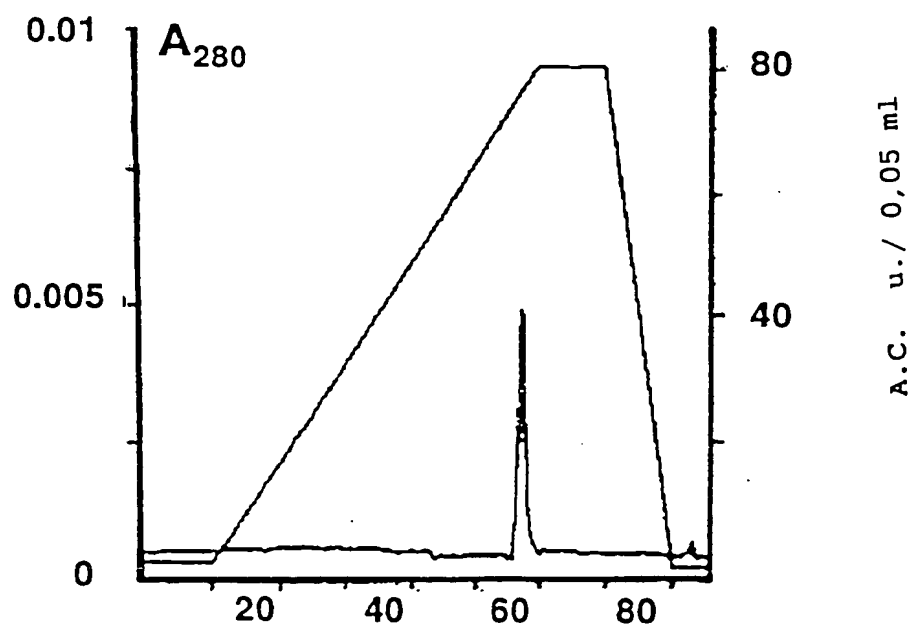


Figure 3A

3 A-S.D.S.- PAGE

Figure 3B

3 B - WESTERN BLOT

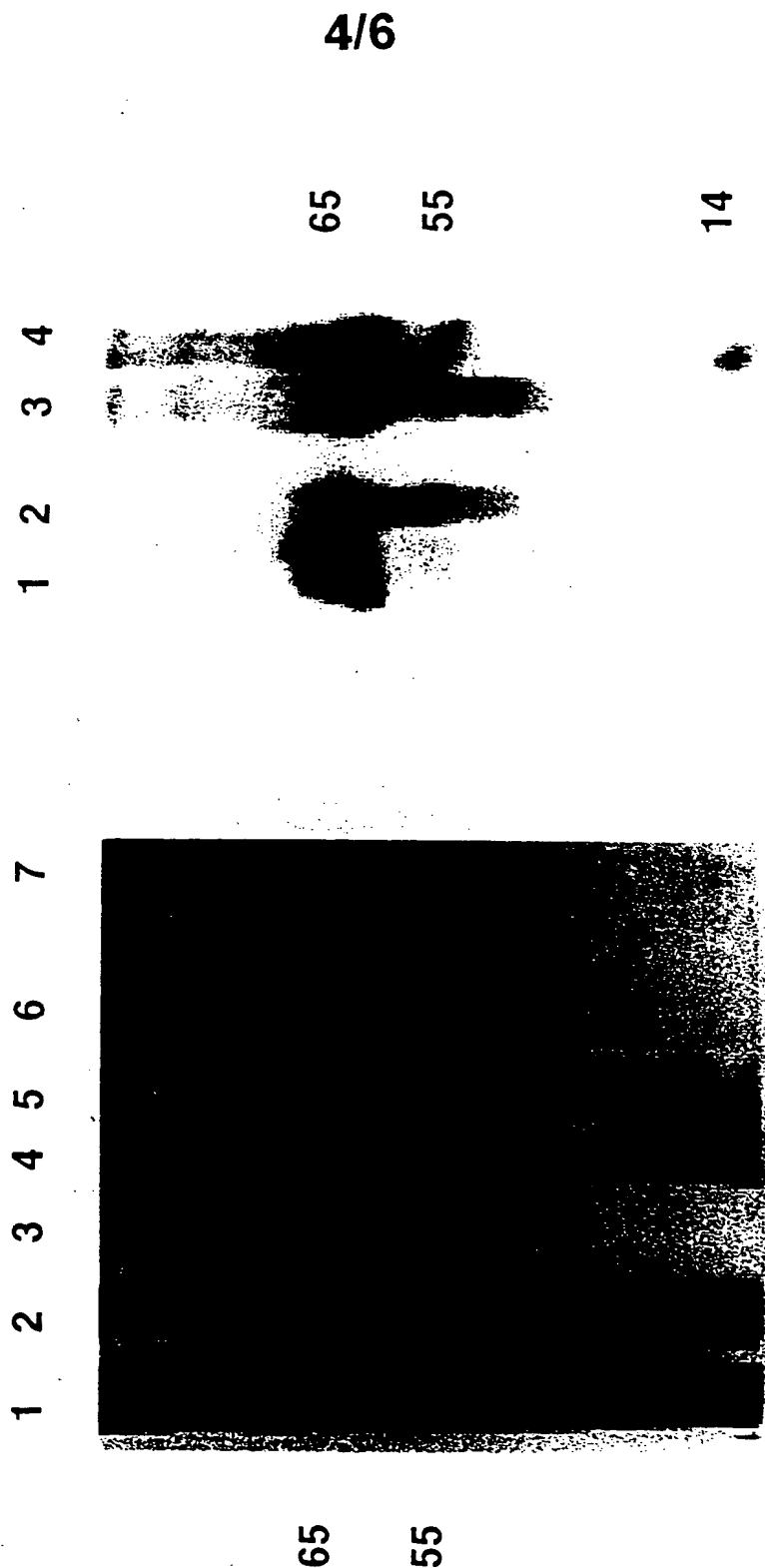




Figure 4 A

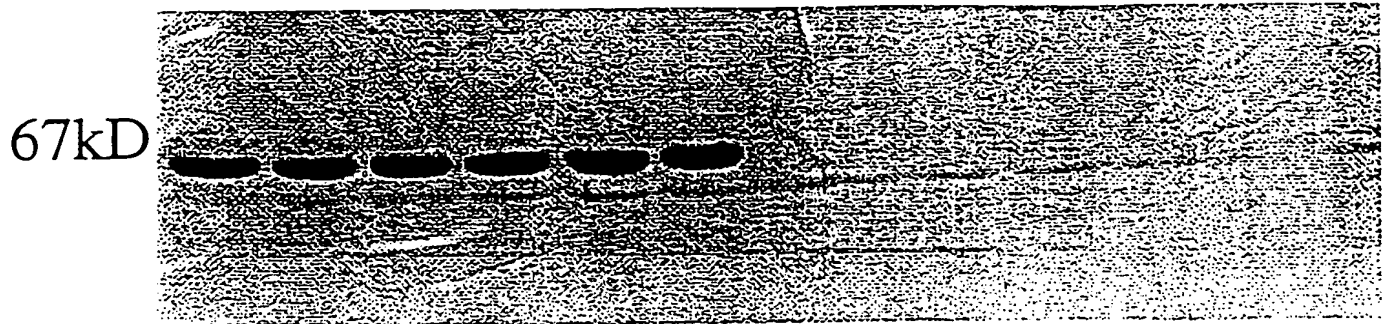
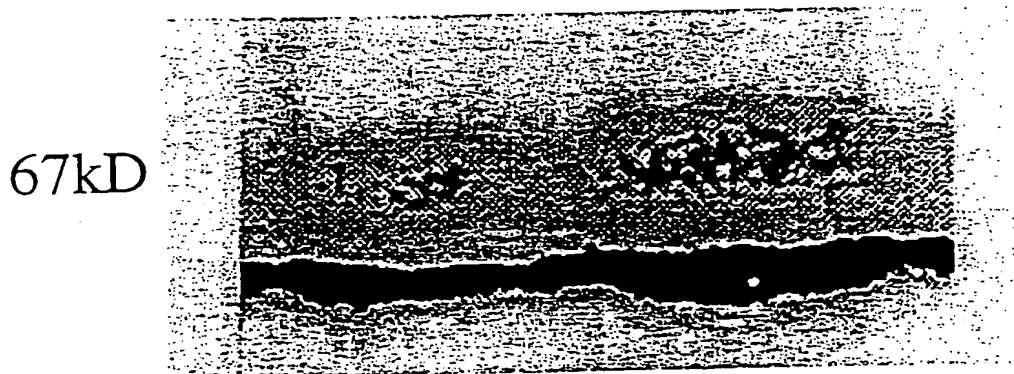


Figure 4 B



6/6

Figure 5

